T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KLONLAMA ILE TRANSGENIK KOYUN ÜRETIMINDE DONÖR HÜCRELERIN NANOPARTIKÜLLER KULLANILARAK TRANSFEKSIYONU, ROSCOVITINE VE TRICHOSTATIN-A ILE YENIDEN PROGRAMLANMASI

SELİN YAĞCIOĞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. SERHAT PABUCCUOĞLU

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Selin YAĞCIOĞLU

İTHAF

Her zaman arkamda duran sevgili annem Nuray Özdemirci başta olmak üzere, babam Norayr Özdemirci, sevgili eşim Alen Yağcıoğlu ve biricik meleğimiz Anjel Yağcıoğlu'na ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Hayatım boyunca eğitimimle titizlikle ilgilenen, her konuda arkamda olup beni kollayan, dinleyen ve hiç yalnız bırakmayan sevgili annem Nuray Özdemirci ve babam Norayr Özdemirci'ye, Anabilim Dalı'mı seçmemde büyük etkisi olan ve akademik hayatımın yönünü değiştiren, en zor zamanlarımızda bile tercihimin arkasında durup vazgeçmeme izin vermeyen Sevgili Eşim Alen Yağcıoğlu'na,

Anabilim Dalı'na katıldığım ilk günden beni kanatları altına alan, aklıma gelen her fikrin gerçekleşebileceğini ve hatta daha fazlasını da yapabileceğimi her zaman hissettiren, mütevazi olup yaptığımız işlerle ön plana çıkmamız gerektiğini gösteren, her adımımı hep daha fazla araştırarak ve okuyarak atmamı sağlayan, fikirlerimin arkasında duran ve onların daha da fazla gelişebilmesi için bilgi birikimini paylaşmayı esirgemeyen, bir danışman hocanın iyi bir mentör olması gerektiğini öğrendiğim Sevgili Doktora Babam ve Hocam Prof.Dr. Serhat Pabuccuoğlu'na,

Başarılı bir bilim kadını, sevgi dolu bir eş ve özenli bir annenin aynı anda olunabileceğini bana gösteren, başarılı olacağıma inanarak bana her zaman yardımcı olan ve eğiten, ileride kendisi gibi hem başarılı hem de mütevazi bir bilim kadını olmak istediğim Sevgili Hocam Prof.Dr. Sema Birler'e, Anabilim Dalı'na geldiğim ilk günden bugüne kadar yardımlarını hiç eksik etmeyen, bana bildiğim birçok şeyi öğreten ve her zaman daha fazla okumamı destekleyerek kendimi geliştirmemi sağlayan Sevgili Abim ve Hocam Doç.Dr. Kamber Demir'e, desteğini hiç esirgemeyip her zaman yol gösteren, disiplinli ve idealist çalışma düzeniyle kendime örnek aldığım başarılı bir bilim kadını olan Prof.Dr.Saadet Pabuccuoğlu'na ve doktora eğitimimin ilk günlerinde yaptığı tez çalışmasıyla bende farkındalık oluşturan ve kendi alanımla polimer teknolojisini birleştirerek farklı alanlara yönelmeme vesile olan Sevgili Abim ve Hocam Doç.Dr. Mehmet Koray Gök'e,

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, sorunlarımızı ivedilikle çözen ve bir baba gibi bizlere kol kanat geren Anabilim Dalı Başkanım Prof.Dr. Kemal Ak'a, hayallerimi gerçekleştirebilmem ve Üniversitemizin akademik apoletini gururla taşımamda büyük katkısı olan Sevgili Hocam Prof.Dr. Serhat Alkan'a, yayın odaklı çalışmanın önemini kavramamı sağlayan, disiplinli çalışma düzeni ve güler yüzüyle hep yanımızda olan Prof.Dr. Mithat Evecen'e, her zaman sorularımı içtenlikle yanıtlayan ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Alper Baran'a ve Prof.Dr. Özen Banu Özdaş'a,

Tecrübesizken bile bana güvenerek ilk embriyo dondurmamı yapmamı sağlayan, tereddüt ettiğim anlarda bu anıyı hatırlayarak ilerlememe yardımcı olan ve her zaman yardımlarıyla yanımda olacağını bildiğim Sevgili Doktora Ablam Arş.Gör.Dr. Gül Bakırer Öztürk'e, her zaman pozitif olan Arş.Gör.Dr. İzem Sandal'a, herkesin yardımına koşan, bana gülümseyerek sıkıntılarımı aşabileceğimi öğütleyen Arş.Gör.Dr. Ramazan Arıcı'ya, uzakta olsa da beraber başarılı çalışmalar yapacağımıza inandığım Arş.Gör. Ahmet Eser'e,

Doktora süresince acı tatlı günler geçirdiğimiz, en sıkıntılı günümüzü bile kahkalarla bitirdiğimiz, beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım Doktora kardeşlerim Vet.Hekim Nur Ersoy, Vet. Hekim Nilhan Coşkun, Vet. Hekim İdil Oruç ve Vet. Hek Israa Faris Mohamed'e, enerjisiyle bulunduğu ortama neşe katan Vet.Hekim Georgios Petrovas'a , uygulama ve çalışmalarda bizlere yardımcı olan Vet.Hekim Mamet Çeşmeci ve Vet.Hekim Hatice Şenlikçi'ye, aramıza sonradan katılan ama ilk günden berabermişiz gibi severek çalıştığım, daha nice yıllar da beraber çalışacağımıza inandığım Sevgili arkadaşım Laborant Ayşenur Çakır'a, tüm çalışmalarda emeği geçen olmazsa olmaz Teknisyen Ercan Ketenci'ye, çalışmamda kullandığım polimerleri üretmek için gece gündüz demeden çalışan, Eczacılık ve Kimya Mühendisliği Fakülteleri arasında mekik dokuyan Emine Büşra Fidan, Kevser Bal ve Sema Şentürk'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 117O345

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... XİV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XVİ
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Reprodüktif Biyoteknolojiye Genel Bakış 3
2.2. Transgenik Hayvan Üretimi 4
2.2.1. Gen Entegrasyonu Teknolojisi 6
2.2.2. Gen Değiştirme Teknolojisi 7
2.3. Transgenik Teknolojinin Uygulama Alanları 9
2.3.1. Hastalık Modelleri Oluşturma 9
2.3.2. Biyofarmasötik Amaçlı Rekombinant Protein Üretimi 10
2.3.3. Hayvancılık Alanında Gelişmeler 14
2.3.4. Ksenotransplantasyon 17
2.4. Transgenik Teknolojide Karşılaşılan Sorunlar 19
2.5. Etik Yaklaşımlar ve Hayvan Refahı 20
2.6. Transgenik Hayvan Üretimi için Uygulanan Yöntemler 20
2.6.1. Retrovirüsler ve Transpozonlar Aracılığıyla DNA Transferi 21
2.6.2. DNA Mikroenjeksiyon Yöntemi 22
2.6.3. Embriyonik Kök Hücre Enjeksiyonu 23
2.6.4. Sperm Aracılığıyla DNA Transferi 24
2.6.5. Gen Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemler Aracılığıyla DNA Transferi 25
2.6.6. Elektroporasyon Yöntemi 26

2.6.7. Somatik Hücre Nüklear Transfer (SCNT) Yöntemi 27
2.6.7.1. SCNT Yöntemine Genel Bakış 27
2.6.7.2. SCNT Yöntemi ile Transgenezis 27
2.6.7.3. SCNT Yönteminde Başarıyı Yakalamak 30
2.6.7.4. SCNT Yönteminde Başarıyı Etkileyen Faktörler 32
2.6.7.4.1. Konak Hücrenin Sitoplazmik Aktiviteleri 32
2.6.7.4.2. Enükleasyon 34
2.6.7.4.3. Donör Nükleus 35
2.6.7.4.4. Füzyon ve Aktivasyon 37
2.6.7.4.5. Epigenetik Yeniden Programlama 38
2.6.7.4.5.1. Donör Nükleusun Yeniden Modellenmesi ve Programlanması 38
2.6.7.4.5.1.1. DNA Metilasyonu ve Histon Asetilasyonu 39
2.6.7.4.5.1.2. Donör Nükleusun Yeniden Programlanmasında Kullanılan Yöntemler 42
3. GEREÇ VE YÖNTEM 45
3.1. Çalışmada Kullanılacak Materyal 45
3.2. Fibroblast Hücre Hatlarının Elde Edilmesi 45
3.2.1. Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurulmasında Kullanılan Medyumlar 45
3.2.2. Primer Koyun Embriyonik Fibroblast (PKEF) Hücre Hattının Elde Edilmesi 48
3.2.3. Primer Koyun Erişkin Fibroblast (PKF) Hücre Hatlarının Elde Edilmesi 50
3.2.4. Erişkin ve Embriyonik Fibroblast Hatlarının Dondurulması 51
3.3. Gen taşıyıcı Nanopartiküllerin Sentezi ve Transgenezis için Gen Yüklemesi 52
3.3.1. Modifiye Kitosan Sentezi 52
3.3.2. PBAE Sentezi 52
3.3.3. nLDH Bileşiklerinin Sentezi 52
3.3.4. Gen üretimi, Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Optimizasyonu 53
3.3.4.1. Gen Üretimi 53
3.3.4.1.1. Kullanılan Medyumlar 53
3.3.4.1.2. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması 54
3.3.4.1.3. Kompetent Hücrelerin Transformasyonu 55
3.3.4.1.4. pEGFP-N1 Plazmid Eldesi 56

3.3.4.2. Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Jel Elektroforez Kontrolleri 57
3.4. Hücre Hatlarında Gen Transferi 58
3.4.1. PKF ve PKEF Hücre Hatlarının Transfeksiyon Öncesinde Hazırlanması 58
3.4.2. Nanopartikül-Plazmid Komplekslerinin Hazırlanması 59
3.4.2.1. nmChi-plazmid Kompleksinin Hazırlanması 59
3.4.2.2. LDH-plazmid Kompleksinin Hazırlanması 59
3.4.2.3. PBAE-plazmid Kompleksinin Hazırlanması 59
3.4.2.4. Lipofectamine® -plazmid Kompleksinin Hazırlanması 60
3.4.3. PKF ve PKEF Hücrelerinin Nanopartikül-Plazmid Kompleksleri ile Transfeksiyonu 60
3.4.4. Transfekte Hücre Gruplarının Seleksiyonu 60
3.4.5. Seleksiyonu Yapılan Transfekte Hücrelerin Dondurularak Saklanması 61
3.5. Transfekte Somatik Hücre Gruplarının Yeniden Programlanması 62
3.5.1. Yeniden Programlama İçin Kullanılacak Solüsyonlar 63
3.5.2. Kontakt İnhibisyon 63
3.5.3. Serum Açlığına Bırakma 63
3.5.4. Roscovitine Uygulaması 64
3.5.5. Trichostatin A Uygulaması 64
3.6. PKF ve PKEF Hücrelerinde Yapılan Analizler 64
3.6.1. Transfeksiyon Etkinliği Analizleri 65
3.6.2. Apoptoz Analizleri 65
3.6.3. Hücre Siklusu Analizleri 66
3.6.4. DNA Metilasyon Analizleri 66
3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 67
4. BULGULAR 68
4.1. Fibroblast Hücre Hatlarının Elde Edilmesi 68
4.1.1. PKEF Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurularak Saklanması 68
4.1.2. PKF Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurularak Saklanması 68
4.2. Gen Üretimi, Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Optimizasyonu 68
4.2.1. pEGFP-N1 Plazmid Eldesi ve Uygunluk Kontrolleri 68
4.2.2. Gen Yüklenen Nanopartiküllerin Jel Elektroforez Sonuçları 69
4.2.2.1. PBAE:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları 70
4.2.2.2. nmChi:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları 70

4.2.2.3. nLDH:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları.....71
4.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Gen Transferi.....72
4.3.1. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Transfeksiyon Optimizasyonu 72
4.3.2. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Seleksiyon Optimizasyonu.....81
4.3.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Hücre Siklusu Senkronizasyonu Optimizasyonu.....83
4.3.3.1. Roscovitine Doz Uygulaması.....83
4.3.3.2. Trichostatin A Doz Uygulaması.....85
4.3.3.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Hücre Siklus Gruplarının Karşılaştırmalı Analizleri 87
4.3.3.4. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Metilasyon Analizi Optimizasyonu 89
4.4. Transfekte PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Yeniden Programlama Analiz Sonuçları.....92
5. TARTIŞMA 99
KAYNAKLAR 118
ETİK KURUL KARARI 139
PATENT HAKKI İZNİ 140
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....141
ÖZGEÇMİŞ 142

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. Farklı transgenik hayvan türlerinin rekombinant protein eldesine yönelik karşılaştırılması (Houdebine, 2009) 13
Tablo 2-2. Transgenik hayvanların meme bezlerinden elde edilen rekombinant insan proteinleri (Samiec ve Skrzyszowska, 2011) 14
Tablo 2-3. Hayvan üretimini geliştirmeye yönelik çalışma alanları (Houdebine, 2002) 16
Tablo 3-1. Stok hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması 45
Tablo 3-2. %1 antibiyotikli hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması 46
Tablo 3-3. %10 antibiyotik ilaveli hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması 46
Tablo 3-4. Stok Hücre kültür medyumunun (HKM) hazırlanması 46
Tablo 3-5. %10 FCS ilaveli HKM hazırlanması 46
Tablo 3-6. %20 FCS ilaveli HKM hazırlanması 47
Tablo 3-7. %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonunun hazırlanması 47
Tablo 3-8. Stok hücre dondurma medyumunun hazırlanması 47
Tablo 3-9. %40 FCS ilaveli hücre dondurma medyumunun hazırlanması 47
Tablo 3-10. %20 DMSO ilaveli hücre dondurma medyumunun hazırlanması. 47
Tablo 3-11. CaCl2 solüsyonu hazırlanması 53
Tablo 3-12. Luria-Bertani (LB) medyumunun hazırlanması 53
Tablo 3-13. LB agar besi yerinin hazırlanması 53
Tablo 3-14. Süper Optimal Medyumun (SOM) hazırlanması 54
Tablo 3-15. TAE Buffer 50X hazırlanması 54
Tablo 3-16. TAE Buffer 1X hazırlanması 54
Tablo 3-17. %1,5 agaroz jelin hazırlanması 54
Tablo 3-18. Serum açlığı için kullanılacak %0,5 FCS ilaveli HKM 63
Tablo 3-19. Roscovitine stok 63
Tablo 3-20. Trichostatin A stok 63
Tablo 4-1. PKF hücrelerinde transfeksiyon etkinliği oranları 75
Tablo 4-2. PKF hücrelerinde apoptotik aktivite oranları 76
Tablo 4-3. PKF hücrelerinde membran bütünlüğü oranları. 77
Tablo 4-4. PKEF hücrelerinde transfeksiyon etkinliği oranları (%). 78
Tablo 4-5. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası apoptotik aktivite oranları 79

Tablo 4-6. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası membran bütünlüğü oranları 80
Tablo 4-7. PKEF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları..... 84
Tablo 4-8. PKEF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları. 84
Tablo 4-9. PKF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları..... 85
Tablo 4-10. PKF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları 85
Tablo 4-11. PKEF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları..... 86
Tablo 4-12. PKEF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları 86
Tablo 4-13. PKF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları..... 87
Tablo 4-14. PKF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları 87
Tablo 4-15. PKEF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücre sikluslarına göre hücre dağılım değerleri 88
Tablo 4-16. PKEF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücrelerdeki apoptotik aktivite oranları..... 88
Tablo 4-17. PKF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları 89
Tablo 4-18. PKF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücrelerdeki apoptotik aktivite oranları..... 89
Tablo 4-19. Metilasyon analizinde denemesi yapılan primer ve sekonder antikor oranlarının hücre konsantrasyonları..... 90
Tablo 4-20. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik aktivite oranları 92
Tablo 4-21. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklusları dağılım oranları..... 93
Tablo 4-22. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranları 94

Tablo 4-23. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik aktivite oranları 95
Tablo 4-24. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklusları dağılım oranları..... 96
Tablo 4-25. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranları 97

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Yabancı bir genin bir hayvan genomuna rastgele entegrasyonu (Houdebine, 2002)..... 7
Şekil 2-2. Spesifik bir gen değiştirme tablosu (Houdebine, 2002). 8
Şekil 2-3. Çiftlik hayvanında gen hedeflenmesinin şematize edilmesi (Niemann ve Kues, 2003). 9
Şekil 2-4. Farklı sistemler tarafından üretilen rekombinant proteinlerin glikozilasyon şemaları (Houdebine, 2004). 11
Şekil 2-5. Transgenik hayvan üretimi için farklı yöntemler (Houdebine, 2009)..... 21
Şekil 2-6. Katyonik polimerlerin yabancı DNA ile oluşturdukları polipleks yapıların gen transferinde hücre içine girmesi (Chen ve ark., 2020). 26
Şekil 2-7. Somatik hücrelerde oluşturulan genetik mutasyonun klonlama tekniği ile aktarımı (Houdebine, 2002). 29
Şekil 2-8. Transgenik hayvan üretiminde DNA mikroenjeksiyonu ve transfekte donör hücreler ile nüklear transfer yöntemlerinin karşılaştırılması (Wolf ve ark., 2000).... 31
Şekil 2-9. Oosit maturasyonu ve fertilize zigotun ilk hücre siklusu sırasında şekillenen değişimler (Campbell ve ark.,1996)..... 33
Şekil 2-10. SCNT yönteminin sistematik olarak açıklaması (Wang ve ark., 2020)..... 34
Şekil 2-11. SCNT sırasında epigenetik yeniden programlamayı geliştirmeye yönelik şema. (Wang ve ark.,2020). 41
Şekil 3-1. Mezbahadan getirilen fetüsten primer hücre kültür hazırlanması. 48
Şekil 3-2. Primer koyun embriyonik fibroblast hücre hattı 49
Şekil 3-3. Primer koyun fibroblast hücre hattı..... 50
Şekil 3-4. Çalışmada kullanılan yeşil floresan işaret geni (eGFP) içeren plazmidin haritası (pEGFP-N1) 56
Şekil 3-5. Elde edilen plazmidlerin spektrofotometre ile ölçüm sonuçlarına bir örnek . 57
Şekil 3-6. PKF (A) ve PKEF (B) hücre hatlarının %60-70 oranında yayılım göstermesi örnek görüntüsü 59
Şekil 4-1. Üretilen plazmidlerin HEK293 hücre hattında Lipofectamine® ile transfeksiyon sonucu görüntüsü 69
Şekil 4-2. PBAE:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü 70

Şekil 4-3. nmChi:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü 71
Şekil 4-4. nLDH:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü 71
Şekil 4-5. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası natif kontrollerdeki görüntü..... 74
Şekil 4-6. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen transfeksiyon plot grafikleri. 75
Şekil 4-7. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen apoptoz plot grafikleri. 76
Şekil 4-8. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen membran bütünlüğü plot grafikleri. 78
Şekil 4-9. Yöntemdeki iyileştirmeler sonrasında PKF hücre hattında PBAE ile transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen transfeksiyon plot grafikleri... 81
Şekil 4-10. Yöntemdeki iyileştirmeleri takiben PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası hücrelerin natif kontrolünde gözlemlenen yeşil ışıma. 81
Şekil 4-11. Transfekte PKF hücre hattında G418 ile yapılan seleksiyon sonrası görüntüler. 82
Şekil 4-12. PKF hücre hattında hücre senkronizasyonu sonrası akış sitometrisinde elde edilen hücre siklusu senkronizasyonu histogram grafiği. 83
Şekil 4-13. FITC konjugatlı antikor ile işaretlenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü. 90
Şekil 4-14. PKF hücre hattında DNA metilasyon protokolü optimizasyonunun akış sitometrisinde elde edilen histogram grafiği. 91
Şekil 4-15. Transfekte PKF hücre hattında DNA metilasyonunun akış sitometrisinde elde edilen histogram grafiği. 91
Şekil 4-16. Transfekte PKF ve PKEF hücre hatlarının DNA metilasyon sonuçlarının karşılaştırmalı histogram grafikleri. 98

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SCNT: Somatik hücre nüklear transferi (somatic cell nuclear transfer)

mChi: Modifiye kitosan

LDH: Çift tabakalı hidroksit bileşiği

PBAE: poli(β-amino ester)

PKF: Primer koyun erişkin fibroblast

PKEF:Primer koyun embriyonik fibroblast

DNA: Deoksiribonükleik asit

GFP: Yeşil floresan proteini (green floresan protein)

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

MII: Metafaz II

MPF: Maturasyon-mayoz-mitoz ilerletici faktör

mtDNA: Maternal DNA

5-aza-dC: 5-aza-20-deoksitidin

Cdk: siklin bağımlı kinaz

HKM: Hücre kültür medyumu

FCS: Fötal buzağı serumu

PBS: Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi

DMSO: Dimetilsülfoksit

P: Pasaj

PVA: Polivinil alkol

LB: Luria-Bertani medyumu

SOM: Süper optimal medyum

6-DMAP: 6-dimetilaminopurin

CHX: Siklohekzimit

ÖZET

Yağcıoğlu, S. (2020). Klonlama ile Transgenik Koyun Üretiminde Donör Hücrelerin Nanopartiküller Kullanılarak Transfeksiyonu, Roscovitine ve Trichostatin A ile Yeniden Programlanması.İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Transgenik teknolojide başarıyı artıran klonlama (SCNT) yönteminin, çiftlik hayvanlarının üretiminde etkinliğinin düşük olması donör hücrenin yeniden programlanmasında yaşanan aksaklıklardan kaynaklıdır. Donör hücre DNA'sı oosit tarafından metilasyon seviyeleri düşürülerek oluşturulan yeniden programlamada, oosite bağlı yetersizliklerden kaynaklı kayıplar şekillenmektedir. Bu çalışmada; transgenik teknolojide SCNT yönteminin etkinliğinin artırılması amaçlı sağlıklı transgenik hücre eldesinde yüksek başarı sergileyen gen taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin kullanılması ve donör nükleusun SCNT öncesinde yeniden programlanması amaçlı Roscovitine ve Trichostatin A inhibitörlerinin kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Sunulan çalışmada, poli(β-amino ester) (PBAE), çift tabakalı hidroksit bileşiği (LDH), modifiye kitosan (mChi), Lipofectamine® polimerleri koyun primer erişkin (PKF) ve embriyonik (PKEF) fibroblast hücrelerinde transgenik etkinlikleri, apoptotik aktiviteleri membran bütünlüğü analizleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada, transfekte PKF ve PKEF hücrelerinde, 15 µM Roscovitine veya 50 nM Trichostatin A ile 24 saat muamele etme, kontakt inhibisyon ve serum açlığına bırakma yöntemleri uygulanmış, hücre siklus dağılımları, apoptotik aktivite oranları ve DNA metilasyon oranları yönünden karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda; transgenik hücre üretiminde PBAE'nin (%80,88) Lipofectamine®'e (%51,35) göre daha iyi sonuç verdiği ($p<0,05$), Roscovitine inhibitörünün koyun SCNT çalışmalarına yönelik hücre siklusunu senkronize etmeye uygun olmadığı (%58,51), serum açlığının iki hücre grubunda da erken ve geç apoptoz oranlarının yüksek olduğu ($p<0,05$), kontakt inhibisyon ve Trichostatin A gruplarının G0/G1 hücre (%87,33, %83,49) ve canlı hücre (%94,20, %92,58) oranları açısından en iyi sonuçları verdiği ($p<0,05$), PKF hattında 50 nM Trichostatin A ile en düşük DNA metillenme oranı (%16,79, $p<0,05$) görülmüştür. Sonuç olarak SCNT ile transgenik çiftlik hayvanı üretiminde PBAE gen transferinde başarılı olacağı ve 50 nM Trichostatin A ile muamele yönteminin somatik hücre senkronizasyonunda başarılı olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Koyun, Nanopartikül, Roscovitine, Trichostatin A, Yeniden Programlama

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 117O345

ABSTRACT

Yağcıoğlu, S. (2020). Transfection of donor cells using nanoparticles and reprogramming with Roscovitine and Trichostatin A for the production of transgenic sheep by cloning. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Reproduction and Artificial Insemination. Ph.D. Thesis. Istanbul.

The cloning (SCNT) method which increases the success in transgenic technology, has a low efficiency in farm animals because of the problems in the reprogramming of the donor cell. In the reprogramming of donor cell DNA, the methylation level decreases by means of oocyte. There are losses depending on oocyte deficiencies. In this study, it was aimed to increase the efficiency in transgenic technology by using nanoparticular gene carrier systems, which have high efficiency for transgenic cell production, and to investigate the usability of Roscovitine and Trichostatin A inhibitors for reprogramming donor nucleus for SCNT. Poly(β-aminoester) (PBAE), layered double hydroxide compound (LDH), modified chitosan(mChi) and Lipofectamine® have been used for transfection in sheep primary adult (PKF) and embryonic (PKEF) fibroblast cells. To synchronize the cells to G0/G1 phase and to decrease the methylation of the DNA, 24-hour treatment with 15 µM Roscovitine or 50 nM Trichostatin A, contact inhibition and serum starvation methods were used. PBAE (80.88%) showed better results than the Lipofectamine® (51.35%) in transgenesis ($p<0.05$). Roscovitine had no effect in synchronization(58.51%), high level of early and late apoptosis were obtained in serum starvation ($p<0.05$). The contact inhibition and Trichostatin A exhibited the best results in G0/G1 (87.33%,83,49%) and live cells (94.20%, 92.58%) ($p<0.05$). The lowest DNA methylation rate (16.79%, $p<0.05$) was found in the PKF with 50 nM Trichostatin A. Consequently, PBAE could be an effective gene carrier for transfection of primary fibroblast cells and, the best results in synchronization and demethylation of DNA could be obtained by 50 nM Trichostatin A treatment

Key Words: Sheep, Nanoparticle, Roscovitine, Trichostatin A, Reprogramming

The present work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey. Project No. 117O345

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insan sağlığı ve refahına yönelik önemli bir araştırma ve geliştirme alanı olan transgenezis teknolojisi, kısaca bir canlının genomuna, yabancı bir gen dizilimin transfer edilmesi olarak açıklanabilir. Transgenik teknoloji, birçok farklı alanda kendine yer edinmiş olmasının yanı sıra insanlar söz konusu olduğunda çiftlik hayvanları gibi büyük ırklarda yapılan çalışmalar daha çok dikkat çekmektedir. Çiftlik hayvanlarında hastalık direncinin oluşturulması, insan kaynaklı proteinlerin üretilmesi, ksenotransplantasyon amacıyla genetik modifikasyonlar yapılması örnek verilebilecek çalışma alanlarındandır.

Transgenik hayvan üretiminde; DNA mikroenjeksiyon yöntemi, viral vektörler aracılığıyla gen transferi, gen taşıyıcı nanopartiküler sistemler aracılığıyla gen transferi, sperm aracılığıyla gen transferi, embriyonik kök hücre enjeksiyonu, somatik hücre nüklear transferi (SCNT) yöntemleri kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemler farklı alanlarda ön plana çıkmakla birlikte çiftlik hayvanları söz konusu olduğunda kullanımları sınırlıdır. Özellikle farelerde başarıyla kullanılan DNA mikroenjeksiyon yönteminin, transgenik çiftlik hayvanı üretiminde etkinliğinin düşük olması SCNT yöntemindeki çalışmaların ön plana çıkmasına neden olmuştur.

İlk klonlanan memeli olarak, 1997 yılında klon koyun Dolly ile öne çıkan SCNT çalışmaları biyoteknolojik araştırmaların da getirisiyle 2018 yılında ilk insan olmayan primat türünün başarıyla klonlanmasıyla günümüze kadar gelmiştir. Son 20 yılda teknolojinin geldiği nokta tartışmasız başarıyı göstermesine rağmen, SCNT teknolojisinin etkinliğinin istenilen düzeyde olmadığı da önemli bir gerçektir. Etkinliğin artırılmasına yönelik birçok çalışma yapılmasına rağmen, en önemli araştırma konusunun epigenetik yeniden programlamanın gerekliliğinin olduğu bilinen bir gerçektir. Çalışmalarda görülmüştür ki, SCNT uygulamalarında kullanılan donor hücrenin hücre siklusu açısından G0/G1 fazında olması başarıyı etkileyen en önemli noktadır. Bu hücrelerin yeniden programlanması sırasında somatik hücrenin ooplast ile birleştirilmesi sonucu, ooplastın yapısındaki faktörler sayesinde DNA demetilasyona uğrayarak metillenme oranları ciddi oranda düşürülmektedir. Bu da özelleşmiş bir hücrenin yeniden programlanarak embriyo hücresine dönüşmesi ile sağlanmaktadır. Ancak, ooplast kaynağı oositlerdeki bir takım yetersizlikler yeniden programlanma sürecinde önemli

etkisi olması nedeniyle başarısızlıklara neden olmakta, klonlama ile üretilen embriyolarda daha ilk yarıklanmalar döneminde büyük kayıplara neden olmaktadır.

Transgenik teknolojide, transgenik hücre hatları kullanılarak nüklear transfer yöntemi uygulanması birçok açıdan avantaj sağlamaktadır. Hücre hatlarına transfer edilen gen dizilimlerinin transfer öncesinde analizlerinin yapılabilmesi, dişi veya erkek hücre hattı seçilimi, mozaizm şekillenmemesi ve elde edilen hayvanların tamamının %100 transgenik olması önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu anlamda yöntemin etkinliğinin artırılması için donör hücrelerin yeniden programlanarak kullanılması da önemli çalışma konularından biridir.

Bu çalışmanın amacı, transgenik teknoloji ve özellikle gen terapisinde önemli bir araç olarak yer alan gen taşıyıcı nanopartiküller sistemlerin kullanılabilirliğini artırmak ve transgenik çiftlik hayvanı üretiminde en başarılı yöntemlerden biri olan donör somatik hücrelerin senkronize edilmeleri ve hücre transferi öncesinde DNA'nın metilasyon seviyelerinin düşürülerek yeniden programlanmasında farklı yöntemleri karşılaştırarak değerlendirmek, böylece koyunlarda SCNT etkinliğini artırılmasına katkı sağlayacak donor hücre hazırlama yöntemi geliştirmektir.

Sunulan çalışmada ilaç, gen gibi biyolojik moleküllerin salınımında kullanılan gen taşıyıcı nanopartiküler sistemler içerisinde yer alan poli β-amino ester (PBAE), çift tabakalı hidroksit bileşiği (LDH), modifiye kitosan (mChi) ve Lipofectamine® polimerlerinin koyun primer erişkin (PKF) ve embriyonik (PKEF) fibroblast hücrelerinde transgenik etkinlikleri, apoptotik aktiviteleri ve membran bütünlüğü analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır.

Gen taşıyıcı nanopartiküler sistemler ile transfekte edilen donör hücre PKF ve PKEF hücrelerin senkronizasyonu ve nükleuslarının yeniden programlanması amacıyla; Roscovitine ve Trichostatin A kimyasal inhibitörleri, PKF ve PKEF hücrelerinde uygun çalışma dozları belirlenmiş ve kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma yöntemleri ile apoptotik aktivite oranları, hücre siklus dağılımları ve DNA metilasyon oranları yönünden ilk defa incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Reprodüktif Biyoteknolojiye Genel Bakış

Hayvan yetiştiriciliği; insanın hayvanları evcilleştirmesi ile başlamış ve teknolojinin de etkisiyle günümüzdeki konumuna gelmiştir. Geçmişte hayvanlar fenotipik ve spesifik özelliklerine göre seleksiyon yapılarak üretilirken, genetik ve istatistik alanlarında mevcut bilginin de artmasıyla birlikte son 50 yılda hayvan yetiştiriciliği bilimsel temellere oturmaya başlamıştır. Bu amaçla, biyoteknolojik yöntemlerden biri olan suni tohumlama özellikle sığır yetiştiriciliğinde bütün ülkelerde reprodüksiyon programlarına dahil olmuştur. Suni tohumlama teknolojisinin, baba seçimi ile %50 genetik ilerleme sağlamasının yanında, 1980'lerin başında embriyo transfer teknolojisi de laboratuvar çalışmalarından ticari hayata geçirilmiştir. Bugün, yılda 530.000'in üzerinde sığır embriyosunun Dünya ülkelerinde ticareti yapılmaktadır. Diğer hayvan türlerinde ise bu sayı daha azdır (Thibier, 2001). Hayvan yetiştiriciliği alanında; suni tohumlama ile yararlı sonuçlar alınmasına ve performans artışı gözlenmesine rağmen bazı sınırlamalar yetiştiricileri kısıtlamaktadır. Bunlar 4 maddede incelenebilir;

1. Genetik ilerlemenin yılda %1-3 civarında yavaş olması,
2. İstenilen özelliklerin istenmeyen özelliklerden ayrılmasının zorluğu,
3. Farklı hayvan türleri arasında hedeflenen genetik bilginin transferinin mümkün olmaması,
4. Bölgesel koşullara adaptasyon güçlüğü.

Bu güçlükleri aşmak için; çiftlik hayvanlarında biyoteknoloji adı altında reprodüktif biyoteknoloji ve moleküler biyoteknoloji birleşerek ilerleme kaydedilmeye başlanmıştır (Niemann ve Kues, 2003). Biyoteknoloji ve gen teknolojisinin gelişmesiyle birlikte çiftlik hayvan üretiminde gelecekte karşılaşılacak zorlukların üstesinden gelinebilecek bilgiye sahip olunacaktır.

Yaklaşık 40 yıl önce genetik kodlamanın keşfiyle birlikte, gen izolasyonu ve canlı organizmalara gen transferi yapılabilmesi biyologlar için önemli araçlardan biri haline gelmiştir. Yabancı DNA kullanılarak farelerde gerçekleştirilen ilk gen transferi; hayvanların yabancı DNA'yı kararlı bir şekilde barındırabildiğini ve modifiye fenotipik özellikler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Yine yapılan çalışmalar yabancı genin bir canlının genomuna entegrasyonu sonucu bazı kompleks ve öngörülemeyen biyolojik reaksiyonlar da görülebileceğini açığa çıkarmıştır (Houdebine, 2002).

Transgenezis, yabancı bir DNA (deoksiribonükleik asit) parçacığının başka bir canlının genomuna entegre edilmesi yani kısaca gen transferi yapılmasıdır. Böylece aminoasit kodlu DNA parçacığı, konak canlının genomuna protein sentezi sırasında katılabilmektedir.

Transgenik hayvan ise, bu yöntem kullanılarak oluşturulan canlıya denilir. Transgenezis, gen ifadeleri ve fonksiyonlarının incelenebilmesi için araştırmacılara imkan sağlamaktadır. İnsan genomunun identifikasyonu, medikal ve tarımsal alanlarda uygulamalar, insan hastalıkları için model olarak kullanılan transgenik hayvanlar, transgenik hayvanların sütünden rekombinant proteinlerin eldesi gibi uygulamalar sayesinde transgenezis insanlık için geleceğe ışık tutacak bir teknolojidir.

Genel olarak, transgenik hayvan üretimi amaçları arasında; hayvan genomları hakkında yeni bilgiler edinebilmek, genetik kodları deşifre edebilmek, genetik hastalık modelleri oluşturabilmek, hayvansal ürünlerin özelliklerini geliştirebilmek ve yeni hayvansal ürünler elde edebilmek sayılabilir. Özellikle çiftlik hayvanı düşünüldüğünde, transgenik teknoloji kullanılarak yeni veya gelişmiş hayvansal ürünler elde edilebilmesi, ülke ekonomilerine katkı sağlayabilecektir.

2.2. Transgenik Hayvan Üretimi

Hayvansal üretimi geliştirmek yüzyıllar boyunca üzerinde çalışılan ve çalışılmaya da devam edilecek önemli bir konudur. Seleksiyon, reprodüksiyon sorunları, hastalıklar ve beslenme olmak üzere 4 ana başlık dikkat çekmektedir. Özellikle seleksiyon ve reprodüktif biyoteknoloji hayvansal üretimin ilerlemesine yönelik en çok kullanılan teknolojilerden olduğundan, transgenezis ile de bu alanlarda çalışmalar yapılması hedeflenmiştir.

Konvansiyonel seleksiyon, Darwin ve Mendel kurallarına yani canlı organizmaların genetik özelliklerinin gelecek nesillere aktarımına dayanmaktadır. Genomda mutasyonlar reprodüksiyon sırasında DNA replikasyon hataları, kimyasal DNA modifikasyonları ve kromozomların yeniden düzenlenmesi gibi sebeplerle nadiren şekillenir ve doğada en iyi adapte olabilen bireyler canlı kalır. Bu sebeplerle doğal seleksiyon kontrol edilemeyen mutasyonlara ve belirli genetik özelliklerin aktarımına bağımlıdır. Ayrıca birçok biyolojik fonksiyon aynı kromozomun üzerinde bulunmayan

farklı genler ile ilişkilidir, bu yüzden de ilgili genlerin koordinasyonu ile seleksiyon yapılması karmaşık bir olaydır.

Stres oluşturarak DNA'nın destabilize hale getirilmesi ve böylece fazla sayıda mutasyon oluşturulması mikroorganizmalarda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, mikroorganizmalar yeni koşullara adapte olup canlılıklarını sürdürebilmelerine rağmen; hayati tehlike oluşturduğundan yöntem hayvanlarda genetik modifikasyonlar için uygulanamamaktadır.

Kimyasal ajanlar uygulanarak mutasyon oluşturulması mikroorganizmalarda ve memeli hücrelerinde kompleks yapıda olan organizmalarda kısıtlı kullanılabilmektedir. Genetik işaretleyicilerin sistematik kullanımı ile fenotipik özelliklerden sorumlu genlerin belirlenmesine imkan sağlamaktadır (Brown ve Balling, 2001). Fakat bu uygulama da kısa reprodüksiyon siklusu olan hayvanlarda kullanılabildiğinden çiftlik hayvanlarında uygulamaya girememiştir.

Çiftlik hayvanlarında genom haritalaması ve dizilemesi genlerin bilinmesine imkan sağlayarak, hayvanların sadece fenotipik özelliklerine göre değil allel genlerin dizilenmesiyle de seçilmesine imkan tanıyacaktır. En iyi allel genleri taşıyan atalar seçilerek daha hızlı seleksiyon imkanı sunulacaktır. Böylece bu genler araştırma, genetik tanı ve seleksiyon, gen terapi ve transgenezis amaçlı rekombinant protein üretimi için kullanılabilecektir (Houdebine, 2002).

Çiftlik hayvanlarının genomu hala tam çözümlenemediği için, seleksiyon büyük çoğunlukla fenotipik özelliklerin değerlendirilmesi ile gerçekleşmektedir. Gamet formasyonu sırasında kromozomların yeniden düzenlenmesi için genlerin seçilimine izin vermesine rağmen, bilinmeyen genlerin etkisiyle canlı üzerinde zararlı etkiler oluşabilmektedir. Teorik olarak transgenezis yöntemi ile bu problemlerin üstesinden gelinebilmektedir. Standart seleksiyon, identifikasyon ve bireylerin tercihi reprodüksiyonu sırasında gerçekleşen bir veya daha fazla genin doğal mutasyonu sonucu şekillenir. Transgenezis ise daha kesin bir seleksiyon yöntemidir. Hayvana transfer edilecek referans gen ve olası biyolojik etkileri bilinmesine rağmen, yine de birçok teorik ve etik engelle karşılaşıldığından, damızlık seçimi alanında kullanıma girmemiştir (Houdebine, 2002).

Epigenetik mekanizmaların gen ifadelerinin kontrolünde rol oynadığı bilinmekle beraber, bu mekanizmalar kalıtım ve seleksiyondan etkilenmezler. Birçok

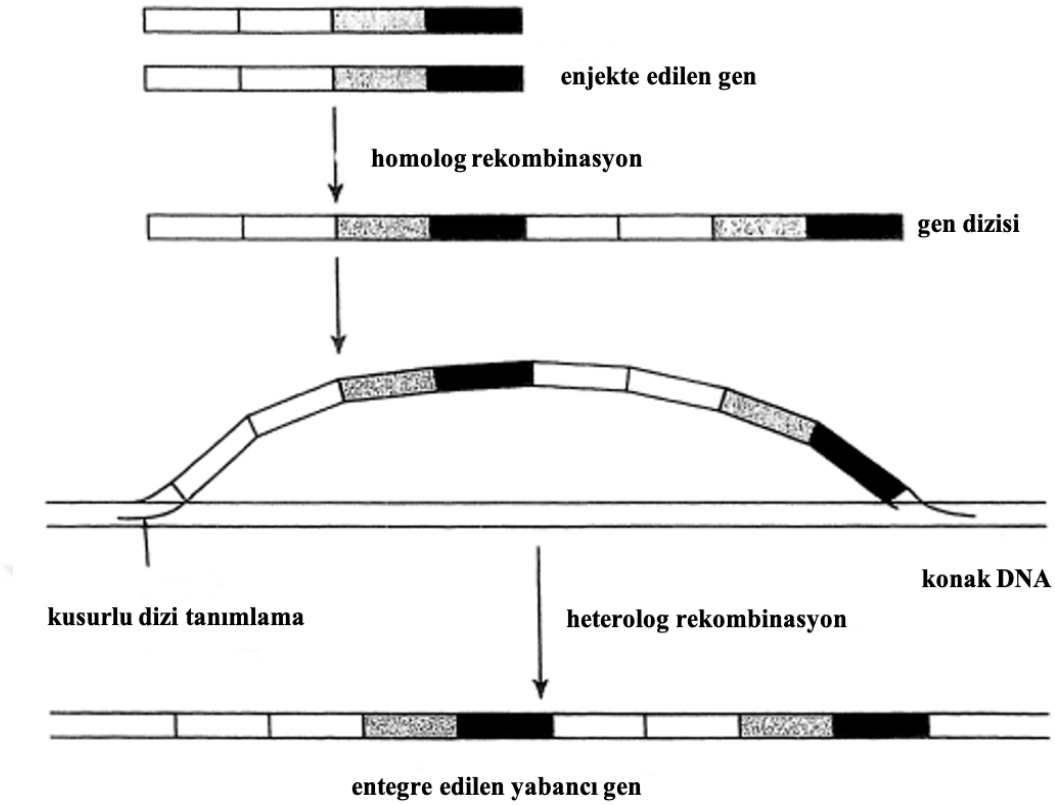
retrotranspozon ve diğer bencil gen dizisi metillenmiş yani inaktif durumdadır. Erken embriyonik gelişim sırasında, DNA geçici olarak demetile olur ve tekrar metillenir. Bencil gen dizilerinde bu durum rastgele şekillendiğinden, bu diziler aktif veya bilinmeyen bir durumda olurlar. Verilen genin ifadesinin kontrolü, komşu retrotranspozonların rastgele metilasyonuna bağımlıdır. Bu durum transgenler için de geçerli olduğundan, bir transgenik hatta birçok farklı transgen ifadesinin görülmesini de açıklamaktadır (Whitelaw ve Martin, 2001; Symer ve Bender, 2001; Rakyan ve ark., 2001).

Transgenezis ile transgenik hayvan üretimi genel anlamda, yabancı genin rastgele entegrasyonu veya homolog rekombinasyon kullanılarak gen değiştirme yöntemleri ile gerçekleştirilmektedir.

2.2.1. Gen Entegrasyonu Teknolojisi

Gen entegrasyonunda, ilave genetik bilgi kararlı bir şekilde bir hayvanın genomuna eklenir. Yabancı gen genellikle aynı veya farklı bir türden canlıya ait bir protein kodudur. İlave gen, endojen bir genin ifadesini baskılamak için transfer edilebildiği gibi, yeni bir proteinin sentezlenmesi için de transfer edilir. Yabancı DNA dizisi genomun kısa ve kısmi homolog bölgesini tanır ve onarım mekanizması yabancı DNA'yı entegre eder. Entegrasyon öncesinde, homolog rekombinasyon mekanizması yabancı genin polimerlerini oluşturur (Şekil 2-1; Houdebine, 2002).

Embriyolarda yürütülen gen entegrasyonu çalışmalarında kullanılan yöntemlere pronüklear enjeksiyon, intrasitoplazmik enjeksiyon, sperm aracılığıyla gen transferi, retrovirüsler aracılığıyla gen transferi örnek verilebilir. Hücre bazında (somatik hücre, embriyonik kök hücre vb) kullanılabilecek yöntemler arasında ise hücre membranını hedefleyen kimyasal yöntemler, gen taşıyıcı nanopartiküler sistemler ve elektroporasyon yöntemleri en bilinen yöntemlerdir.



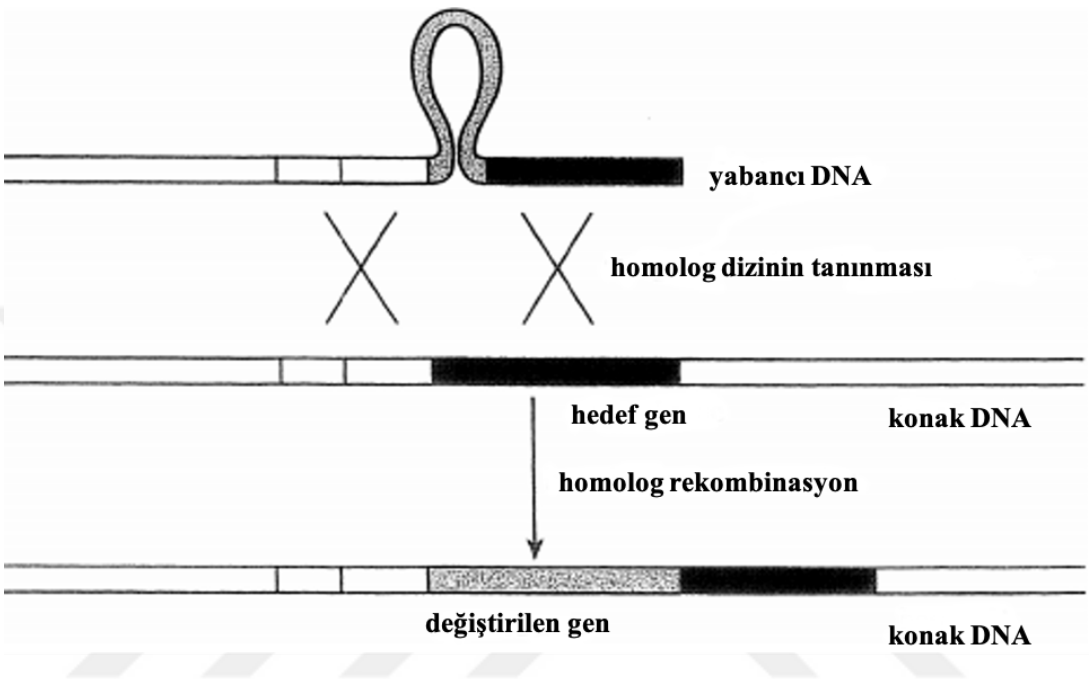
Şekil 2-1. Yabancı bir genin bir hayvan genomuna rastgele entegrasyonu (Houdebine, 2002)

2.2.2. Gen Değiştirme Teknolojisi

Gen değiştirmede, öncelikle canlılın DNA'sındaki hedeflenen gen restriksiyon enzimleri ile kesilip çıkarıldıktan sonra aynı yere inaktif bir gen transfer edilir, böylece endojen gen nakavt edilmiş olur. Yabancı DNA, endojen genin veya sessiz farklı bir genin mutasyona uğramış aktif hali olabilir. Hedeflenen konak gene homolog olan iki uzun bölge içeren gen konstraktı ve yabancı DNA bölgesi transfer edilir. Sonrasında homolog bölgeler yeniden birleşerek, hedef gen yabancı gen ile yer değiştirir (Şekil 2-2; Houdebine, 2002).

Gen değiştirme, homolog rekombinasyon ile gerçekleşir ve uygun vektörler gen değiştirmenin gerçekleştiği hücreleri klonlamak için kullanılmalıdır (Viville, 1997). Gen değiştirmenin gerçekleştiği hücreler, mutasyonun yavruya aktarımı için embriyo gelişiminde rol alabilmelidir. Embriyonik kök hücreler farelerde bu amaçla kullanılmış ve 5000'e yakın genin nakavt edilmesinde uygulanmıştır. Gen değiştirilmesinde rol oynayan pluripotent embriyonik hücreler alıcı embriyoya transfer edilerek, embriyonun

kimerik yavruya gelişiminde yer alır. Bu şekilde mutasyon yavruya aktarılabilir (Houdebine, 2002). Gen değişimi yapılmış hücreleri taşıyan kimerik canlıdan yavru üretimine gidilerek mutasyonlu canlılar elde edilmiş olur. Gen değişimi yöntemi diğer hayvan türlerine de uygulanmış, fakat farelerdeki başarı elde edilememiştir.

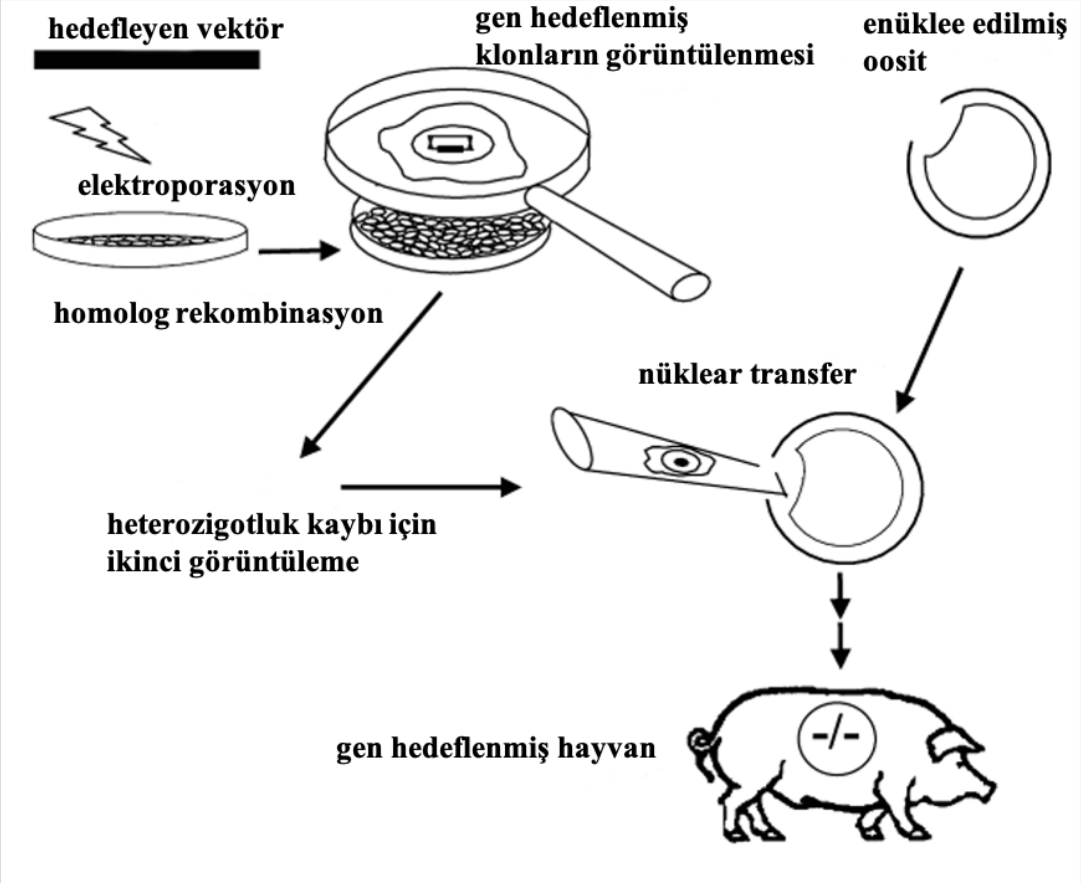


Şekil 2-2. Spesifik bir gen değiştirme tablosu (Houdebine, 2002).

Çiftlik hayvanlarında nakavt teknolojisi, Belçika Mavisi ve Piedmont gibi birçok etçi sığır ırkının ortaya çıkmasıyla birlikte ön plana çıkmıştır. Bu ırklar, mutasyona uğramış miyostatin geni için tesadüfi homozigottur. Doğal olarak gelişen mutasyon sonucu bu hayvanlar, kas gelişimini kontrol eden genin fonksiyonel olarak inaktif, dolayısıyla doğal nakavt hayvanlar olarak tanımlanabilirler. Bu sığırlar ile miyostatin nakavt fareler fenotipik benzerlik gösterdiğinden, miyostatinin çiftlik hayvanlarında genetik modifikasyon için yararlı bir hedef olabileceği düşünülmüştür (McPherron ve Lee, 1997).

Nüklear transfer yöntemi (SCNT), fonksiyon eksikliği olan transgenik çiftlik hayvanları jenerasyonunu üretmek için gerçek totipotent hücre ihtiyacını gidermeyi vaat etmektedir. Bu yöntemde, somatik hücrelerin enüklee oositlere transferi ile gen aktarımında kullanılması; koyunda (Ayares, 1999; McCreath ve ark., 2000) ve farede (Readeout ve ark., 2000) başarılı olmuştur (Şekil 2-3, Niemann ve Kues, 2003).

Fakat; gen değiştirmede kullanılan primer fötal fibroblastların sınırlı bölünme kapasitesine sahip olması, homolog rekombinasyonun somatik hücrelerde embriyonik kök hücrelere göre daha az sıklıkta görülmesi ve nüklear transferin hücreler önceden kültüre edildiğinde daha da azalan düşük verim göstermesi (Well, 2001; Denning ve ark., 2001) gibi sebepler yöntemin başarısını etkilemektedir.



Şekil 2-3. Çiftlik hayvanında gen hedeflenmesinin şematize edilmesi (Niemann ve Kues, 2003).

2.3. Transgenik Teknolojinin Uygulama Alanları

2.3.1. Hastalık Modelleri Oluşturma

Farelerde, yaklaşık 5000 gen üzerinde yapılan çalışmalarda homolog rekombinasyon ile nakavt fare üretilmiş ve bu durum farenin insan hastalıkları çalışmalarında model olarak kullanılmasına imkân tanınmıştır. Farenin bu amaçla en çok kullanılan hayvan olmasının yanı sıra, çalışmalar meyve sineğinin insanlar ile %60 oranında gen benzerliği taşıması, tüm genomunun deşifre edilmiş olması ve

manipülasyonunun daha kolay olması nedeni ile insan hastalıkları çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir (Bernards ve Hariharan, 2001). Bunların dışında, sıçanlar (Charreau ve ark.,1996), tavşanlar (Fan ve ark.,1999) ve domuzlar metabolik özellikler açısından insanlara daha yakın olmaları ve büyük hayvanlarda cerrahi işlemlerin daha kolay yapılabilmesi nedeniyle hastalık modeli oluşturmada ön plana çıkmaktadır. Bu amaçla, homolog rekombinasyonla gen değiştirme için klonlama yöntemi sıklıkla kullanıldığı gibi, vektörler aracılığıyla da gen mutasyonu oluşturabilme özellikle kanser alanında yapılan çalışmalar ile dikkat çekmektedir. Bazı vektörlerin K-Ras genini sporadik olarak ve tek bir hücrede mutasyona uğratabilmesi sonucu, doğal genetik değişiklikler şekillenerek tümör gelişimi oluşturulabilmiştir (Houdebine, 2002).

2.3.2. Biyofarmasötik Amaçlı Rekombinant Protein Üretimi

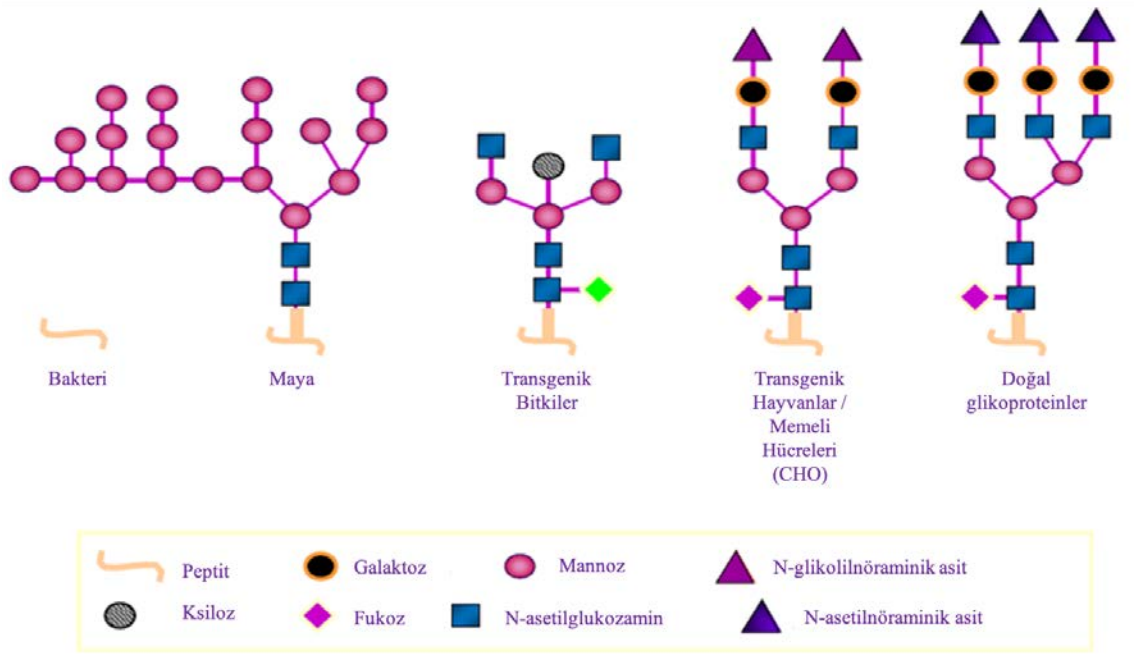
Transgenik hayvanların ilaç sektöründe rekombinant protein kaynağı olarak kullanılabileceği fikri; ilk transgenik farenin sıçan büyüme faktörü hormonu geni ifadesi ile ortaya çıkmıştır (Houdebine, 2000). Biyo-reaktör olarak tanımlanan transgenik çiftlik hayvanlarında, insan sağlığında kullanılmak amaçlı terapötik proteinlerin üretilmesi önemli imkânlar sunmaktadır. Genetik mühendisliği sayesinde; hayvanlardan, bitkilerden veya bakteri türlerinden elde edilebilen proteinler, memeli hayvanların sütünden de temin edilebilmektedir (Bremel, 1989).

Bitki özleri yüzyıllar boyunca farmasötik ajanlar olarak kullanılsa da, terapötik molekül olarak kullanılan ilk protein olan insülin domuz pankreasından elde edilmiştir. 1980'lerin başında insan insülini ve insan büyüme hormonu rekombinant bakterilerden elde edilmeye başlanmıştır. Fakat kısa bir süre sonra, bakterilerin bazı proteinleri özellikle de kompleks yapıda olanları sentezlemedeki sınırlı kapasitelerinden dolayı yetersiz olmaya başlamıştır. Mayalar, büyük miktarlarda rekombinant protein sentezleyebilseler de, bazı mayalar glikozilleme eksikliğinden ya da proteinlere insan proteinlerinde bulunmayan şeker eklediklerinden sorunlar yaşanmıştır. Bu alanda da genetik olarak modifiye edilmiş mayalar üretilerek glikozilasyon problemi aşılsa da, yeni kaynak arayışı devam etmiştir (Houdebine, 2009).

Hayvan ve insan hücreleri özellikle de CHO (Çin Hamster Ovaryum) hücreleri yıllar boyunca başarılı bir şekilde uygulama alanı bulmuştur. Ancak, çok yüksek

maliyetlerle senede sadece birkaç kg rekombinant proteini üretebilmeleri, memeli hücre kültürü sistemlerinin en önemli dezavantajlarındandır (Houdebine, 2009).

Transgenik bitkiler, transgenezisin kolay yapılabilmesi ve rekombinant protein üretebilmelerinden dolayı iyi bir seçenek olarak görülmüştür. Rekombinant proteinlerin bitkilerde sınırsız üretilebilmesi, üretim maliyetlerinin düşük olması, protein içeren yaprak ve tohumların depolanmasının kolay olması bu yöntemin avantajları olarak sayılabilir. Fakat en önemli dezavantaj; bitkilerde sentezlenen proteinlerde terminal siyalik asit bulunmaması ve ksiloz içermeleri (Şekil 2-4; Houdebine, 2004) nedeniyle hastalarda immun reaksiyon oluşturabilmesidir. Transgenik hayvanlar ise, yüksek kalitede rekombinant protein üretebilme imkânı ile bu alanda etkili bir seçenektir.



Şekil 2-4. Farklı sistemler tarafından üretilen rekombinant proteinlerin glikozilasyon şemaları (Houdebine, 2004).

Transgenik organizmalardan rekombinant proteini elde edebilmek için hedeflenen sistemler arasında süt, kan (Houdebine, 2000), yumurta akı (Zhu ve ark., 2005), seminal plazma (Dyck ve ark., 2003), idrar, ipek bezi (Royer ve ark., 2005) ve böcek larvası (Markaki ve ark., 2007) sayılabilir.

Farmasötik proteinlerin üretiminde kullanılan iki büyük hayvan kaynaklı sistem süt ve yumurta akıdır. Lentiviral vektörler ile tavuklarda başarıyla gen transferi

uygulanabilmesi sonucu, yumurta akında protein üretimi umut vaat eden bir sistem olarak görülmüştür (Lillico ve ark., 2007). Primordiyal kök hücrelerinden pluripotent hücre hatlarının da eldesiyle kimerik transgenik tavuklar elde edilebilmiştir (van de Lavoir ve ark., 2006). Yapılan araştırmalar sonucunda, yumurta akının da rekombinant aşılar gibi yabancı proteinlerin üretiminde kullanılabilecek bir kaynak olduğu sonucu ortaya koyulmuştur (Zhu ve ark., 2005).

Günümüzde süt proteinleri ve farmasötik değerde olan bazı proteinler fare, tavşan, domuz, keçi ve koyun sütünden elde edilebilmektedir (Simons, 1987; Buehler, 1990; Ebert, 1991; Wall, 1991; Wright, 1991). Tavşanlar; transgenik F0 ve yavru eldesinin kolay olması, yüksek fertiliteye sahip olmaları, yüksek süt üretimi, prion hastalıklarına karşı duyarsızlık, ciddi hastalıkların insana geçişinin olmaması ile bu alanda avantaj oluşturmaktadır. Domuzlar daha yüksek maliyetlere mal olsalar da, tavşanlara göre daha fazla miktarda süt üretebilme avantajı taşımaktadır. Ruminantlar ise fazla miktarda protein için en uygun ırk olarak gözükmesine rağmen, yabancı genlerin entegrasyonu için klonlama veya lentiviral vektörler gibi yöntemlere ihtiyaç duyulması, reprodüksiyon süresinin diğerlerine göre yavaş olması, prion hastalıklarına karşı duyarlı olmaları ve tavşanlar ya da domuzlar kadar etkili bir şekilde glikozilleme yapamamaları gibi dezavantajlar taşımaktadır (Tablo 2-1; Houdebine, 2009).

Çiftlik hayvanlarının meme bezleri hedeflenmeye ve ksenojenik terapötik proteinlerin sentezlenmesine elverişlidir. Meme bezlerine spesifik promoterler (başlatıcı) kullanılarak hedeflenen gen ifadeleri ile büyük miktarlarda heterolog rekombinant proteinler üretilebilmektedir (Samiec ve Skrzyszowska, 2011).

Biyofarmasötik amaçlı rekombinant proteinlerin genetikleri modifiye edilmiş SCNT hayvanların meme bezlerinde üretilmesinin avantajları arasında; diğer sistemlere göre yüksek üretim verimi, hayvan veya mikrobiyal hücre kültürleri ile kıyaslandığında düşük yatırım maliyetleri, translasyon sonrası modifikasyon gereksinimi ve yüksek saflaştırma maliyetleri gibi dezavantajlarının olmaması sayılabilir. Bu proteinlerin memeli hayvanlarda sentez edilebilmesi ile sütten daha fazla miktarda protein alınabilmektedir. Rekombinant proteinlerin memeli hayvanlardan sentezlenebilmesinin diğer bir avantajı ise, proteinlerin insan kanından elde edildiğinde HIV, hepatit virüsleri gibi patojenlerin bulaşma riskinin elimine edilmesidir (Samiec ve Skrzyszowska, 2011).

Gen transferi, sütten veya diğer biyolojik sıvılardan farmasötik amaçlı rekombinant protein üretimi için esansiyel bir yöntemdir (Houdebine, 2000). Bu teknik ile süt; nutrasötikler, oral aşılar ve sindirim sistemi patojenlerine karşı koruyucu immunoglobulin üretimi için ideal bir araç olarak görülmektedir (Saif ve Wheeler, 1998; Castilla ve ark., 1998; Kolb ve ark., 2001).

Tablo 2-1. Farklı transgenik hayvan türlerinin rekombinant protein eldesine yönelik karşılaştırılması (Houdebine, 2009)

Biyolojik Özellikler	Tavşan	Domuz	Koyun	Keçi	İnek
Gebelik süresi (ay)	1	4	5	5	9
Seksüel olgunluk yaşı (ay)	5	6	8	8	15
Gen transferi ve ilk laktasyon arasındaki süre (ay)	7	16	18	18	33
Bir batında elde edilen yavru sayısı	8	10	1-2	1-2	1
Bir yılda elde edilen süt miktarı (litre)	15	300	500	800	8000
Bir yılda bir dişiden elde edilen rekombinant protein miktarı (kg)	0,02	1,5	2,5	4	40

Mutasyona uğramış fenilalanin içermeyen insan α-laktalbumin geninin ineklere transferi sonucu bu proteinin sütte üretilmesi fenilketonüriden muzdarip hastalara umut olmuştur (PPL Therapeutics, yayınlanmayan veri).

İnsan laktoferrin proteini yüksek miktarlarda transgenik ineklerden elde edilmiştir (van Berkel ve ark., 2002). Keçiden Anti-trombin III (Baguisi ve ark., 1999); koyundan α1-anti-tripsin (McCreath ve ark., 2000) ile kan pıhtılaşma faktörü IX (Schnieke ve ark., 1997); inekten safra tuzuyla uyarılmış lipaz (Chen ve ark., 2002) ve β-kazein ile κ-kazein (Brophy ve ark., 2003); tavşandan büyüme hormonu-somatotropin (Skrzyszowska ve ark., 2006) ve eritropoetin (Aguirre ve ark., 1998); domuzdan domuz laktoferrin ile insan kan pıhtılaşma faktörü IX (Lee ve ark., 2003) transgenik teknolojiyle üretilen proteinlerden bazılarıdır (Tablo 2-2; Samiec ve Skrzyszowska, 2011).

Tablo 2-2. Transgenik hayvanların meme bezlerinden elde edilen rekombinant insan proteinleri (Samiec ve Skrzyszowska, 2011)

Hayvan Türü	Terapötik İnsan Proteini	Tedavisinde Kullanılan Hastalıklar
İnek	Safra tuzuyla uyarılmış lipaz	Pankreas yetersizliği Kistik fibrosis
Koyun	α1-Anti-tripsin	Konjenital amfizem Kistik fibrosis
Koyun	Kan pıhtılaşma faktörü IX	Hemofili Tip A ve Tip B
Keçi	Anti-trombin III	Kalıtsal Antitrombin Eksikliği
Tavşan	Somatotropin	Cücelik hastalığı
Tavşan	Eritropoetin	Konjenital anemi Böbrek yetmezliği
Domuz	Kan pıhtılaşma faktörü IX	Hemofili Tip A ve Tip B

Keçiler, yüksek genetik değer ve süt verimine sahip olduğu ve sütçü ırklar olarak geniş bir biyoçeşitlilik sağladıkları için gen mühendisliğinde kullanılabilecek değerli bir hayvan türüdür. Klon sütçü keçi sürüleri, yüksek süt verimi ve dolayısıyla yüksek miktarda protein eldesi sağlanması gibi özelliklerinin yanı sıra kısa üretim aralığı ve prion hastalıklarının taşınmasında düşük insidansa sahip olmaları ile de rekombinant insan proteini üretiminde ideal bir kaynak olabilir (Samiec ve Skrzyszowska, 2011).

Yapılan bir araştırmaya göre; günlük süt hacimleri ve saflaştırma etkinliği göz önüne alındığında, yılda 100.000 kg insan serum albumini üretmek için 5400 ineğe, 5000 kg α-anti-tripsin üretmek için 4500 koyuna, 100 kg monoklonal antikor üretimi için 100 keçiye, 75 kg Anti-trombin III üretimi için 75 keçiye ve 2 kg insan pıhtılaşma faktörü IX üretimi için 2 domuza ihtiyaç olduğu hesaplanmıştır (Rudolph, 1999).

2.3.3. Hayvancılık Alanında Gelişmeler

Transgenezis, konvansiyonel üreme ile elde edilemeyecek kadar hızlı ve etkin bir şekilde yabancı genetik bilgiye sahip hayvanlar üreterek biyoçeşitliliği artırabilme imkanı sunmaktadır.

Gelişmiş verim ve reprodüktif performans, artan besin yararlanımı ve büyüme oranı, gelişmiş karkas kompozisyonu, gelişmiş süt üretimi ve hastalık direncinin artırılması çiftlik hayvan üretiminde transgenezisin uygulama alanlarındandır (Wheeler, 2003; Tablo 2-3, Houdebine, 2002).

Bu alanda yapılan çalışmaların çoğunlukla araştırmaya yönelik olmasının nedeni, oluşan maliyetler ve karşılaşılan teknik sorunlardır. Yine bu anlamda klonlama tekniğinin gen entegrasyonu ve değiştirmesi için kullanılabilecek durumda olması, çiftlik hayvanlarında üreme teknolojisine farklı bir boyut kazandırmaktadır. Ancak klonlama teknolojisinin de uygulamada yaşanan ve aşılması gereken sorunları bulunmaktadır.

Koyunlarda büyümeyi artırma amaçlı büyüme hormonu ve gelişmiş yün kompozisyonunu sağlamak için keratin transgenleri çalışılmakta olan konulardandır (Houdebine, 2002). Büyüme hormonu veya IGF1 genlerinin ifadesi ile domuz ve koyunlarda yan etki olarak herhangi bir sağlık problemi görülmeden güçlendirilmiş kas gelişimi görülmüştür. Birçok balık türünde, yine büyüme faktörü etkisiyle belirgin ve ciddi bir büyüme artışı gözlenmiştir.

Belirgin hastalıklara dirençli hayvan gelişimi de, üzerinde çalışılan konulardandır. Memeli bezlerinde lisostafin geni taşıyan transgenik farelerin Stafilokok enfeksiyonlarına direnç göstermesi (Kerr ve ark., 2001), bu genin çiftlik hayvanlarında da mastitisten korunma amacıyla kullanılabileceği fikrini getirmiştir. Yang ve ark.'nın 2001 yılında, trans dominant negatif miyostatin geni taşıyan transgenik farelerde kas gelişiminde artış gözlemesi, bu transgen ile çiftlik hayvanlarında da et üretiminde artış sağlanabileceği düşüncesini ortaya koymuştur.

Tükrük bezlerinde veya bağırsaklarında fitaz geni taşıyan transgenik domuz ve farelerin bitkilerdeki fitik asidi sindirmesi, hem doğadaki fosfat salınımının azalmasına hem de hayvanların daha hızlı büyümesine neden olmaktadır (Ward, 2001; Golovan ve ark., 2001). Yem sindirilebilirliğini artırmak için başka sindirim enzimleri de transgenler aracılığıyla kullanılabilir. Bu durumun aynı zamanda; yem israfını ve çevre kirliliğini azaltmak ve hayvanların büyümesini artırmak gibi avantajları da olacaktır. Bir başka çalışmada (Ward, 2000), ruminantlarda sindirim sonucu ortaya çıkan asetatın glikoza dönüşmesi sağlanarak, ruminant yemlerinin kullanımını geliştirmek hedeflenmiştir. Balıklarda, karbonhidrat sindiriminin geliştirilmesi ile balıklar pahalı protein kaynaklı

yemler yerine ucuz olan karbonhidrattan zengin yemlerle beslenebilir ve üretim maliyetleri düşürülebilir (Houdebine, 2002).

Tablo 2-3. Hayvan üretimini geliştirmeye yönelik çalışma alanları (Houdebine, 2002)

Biyolojik Fonksiyonlar	Avantajlar
Hastalıklara direnç gelişimi	Antibiyotik kullanımının azalması Yüksek refah düzeyi Kolay üreme Yüksek üretim İnsanlar için düşük enfeksiyon riski
Sindirim ve metabolizma	Düşük çevre kirliliği Yüksek üretim Yem kullanımında tasarruf Mevcut yeme adaptasyon Metabolik değişiklikler
Süt kompozisyonu	Alerji ve intoleransın azalması Optimize protein kompozisyonu Optimize lipid kompozisyonu Hastalıklara karşı koruma (aktif ve pasif immünizasyon) Gelişmiş nutrasötik içerik
Yün büyümesi	Gelişmiş yün büyümesi Optimize yün kompozisyonu
Karkas büyümesi	Yüksek kas gelişimi Optimize lipid kompozisyonu Düşük yem kompozisyonu
Reprodüksiyon	Yüksek verimlilik

Koyunlarda yün üretimi için lif gelişiminin modifiye edilmesini hedefleyen çalışması ile Bawden ve ark. (1999) yün büyümesini hızlandırarak yün kalitesini artırmayı hedeflemişlerdir.

Süt kompozisyonunda gen entegrasyonu ve değişiklikleri de bu alanda çalışılan önemli konulardan biridir. Sütün kalitesini artırmak için, αS1-kazein (Chanat ve ark., 1999) veya k-kazein (Bösze ve ark., 2001) oranlarının sütte yüksek ifadelerinin sağlanması hedeflenmiştir. Sütündeki laktaz enzimi sayesinde sütteki laktoz

konsantrasyonunun azalması sağlanan transgenik fare (Jost ve ark., 1999), laktoz intoleransı olan hastalar için önemli bir adımdır. Domuzların meme bezlerinde sığır alfa-laktalbumin transgenik ifadesi ile, laktasyon performansının artmasının yanı sıra süt kompozisyonu, süt verimi ve yavru büyümesi de gelişmiştir (Wheeler ve ark., 2001).

Büyüme, reprodüksiyon, karkas kompozisyonu ve diğer biyolojik fonksiyonlar da transgenezis ile ilerleme sağlanabilecek alanlardandır. Büyüme hormonu transferi ile balıklarda (Devlin, 1997) ve domuzlarda (Nottle ve ark., 1997) yapılan çalışmalar bunlara örnektir. Pursell ve ark.'nın 2001 yılında yaptığı çalışmada, iskelet kasında IGF1 ifadesinin kas gelişimini artırdığı görülmüştür.

2.3.4. Ksenotransplantasyon

Her yıl binlerce kişinin organ yetmezliğinden hayatını kaybettiği ve bir o kadar kişinin de organ nakli listesinde sıra beklediği gerçeği dünya ülkelerinin ortak bir sorunudur.

Transgenezis teknolojisi ile, bu alandaki açığı kapatabilmek adına domuzlarda çalışmalar yapılmaktadır. Organ reddinin engellenmesi, insan genomunun anlaşılması ve domuzlarda bu genlerin ifadesinin kontrolü gibi konular üzerine yoğunlaşılması ile bu alanda kalıcı sonuçlar elde edilebilecektir.

Ksenotransplantasyon, uyumsuz olan türler arasında (hayvandan insana) organ ve doku transplantasyonu yapılmasıdır. Talep edilen ve normal koşullar altında karşılanması mümkün olmayan organ ihtiyacı ksenotransplantasyon ile çözülebilir. Ksenotransplantasyon için optimal donör hayvanın domuz olmasının sebepleri arasında;

1. Organ büyüklüğünün insan organlarıyla benzer olması,
2. Domuz anatomisi ve fizyolojisinin insandan çok farklı olmaması,
3. Domuzların kısa reprodüktif siklusları olması ve yavru sayısının fazla olması,
4. Domuzların hızlı büyümesi,
5. Yüksek hijyenik standartlarda bakımın düşük maliyetlerle sağlanabilmesi,
6. Domuzun evcil bir tür olması sayılabilir (Niemann ve Kues, 2003).

Başarılı transplantasyonu gerçekleştirmek için sağlanması gereken bazı önkoşullar vardır. Bunlardan ilki, donör hayvandan insan alıcıya zoonoz hastalıkların

geçişinin engellenmesidir. Özellikle, domuz endojen retrovirüslerinin domuz hücre hatlarında çoğalıp insan hücrelerini enfekte edebildiğinin görülmesiyle bu konu ciddiyet kazanmıştır (Patience ve ark., 1997). Daha sonra yapılan araştırmalarda, gerekli hijyen koşullarına dikkat edildiği takdirde, bugüne kadar yapılan transplantasyonlarda alıcı insanlarda enfeksiyon gözlenmemiştir (Niemann ve Kues, 2003). Bir diğer önemli konu, donör organların hayat döngüsü farklılıkları, büyüme oranları, vücut ağırlığı gibi anatomik ve fizyolojik özelliklerinin insan organlarıyla uyumluluğunun sağlanmasıdır. Transplantasyon sonucu immunolojik organ reddi de karşılaşılan sorunlardan biridir ve farklı şekillerde görülebilir. Birincisi dakikalar içerisinde şekillenebilen hiperakut red; lizis, trombozis, vasküler bütünlüğün bozulması ve organın reddi ile sonuçlanır. İkincisi, günler içerisinde görülebilen akut vasküler red; anemi ve organ yetmezliğine sebep olmaktadır. Üçüncü olarak, nakilden haftalar sonra hücresel red oluşabilir ki bu immun sistem baskılayıcı ilaçlarla kontrol altına alınabilir. Dördüncü olarak, yıllar sonra görülebilen kompleks bir immunolojik süreç sonucu şekillenen kronik organ reddi, yavaş ilerlemekte ve transplantasyonun yeniden yapılması gerekmektedir (Niemann ve Kues, 2003).

Hiper akut organ reddini engellemek için en etkili yöntemin, bu mekanizmayı düzenleyici proteinlerin transgenik domuzlarda sentezlenmesi olduğu düşünülmüştür (Cozzi ve White, 1995). Transplantasyon sonrasında, domuz kaynaklı organın insan vücudunda gerekli proteinleri sentezlemesi ve böylece alıcıda red oluşmasının engellenmesi hedeflenmiştir. Bu uyumluluğu test etmek adına, primatlarla çalışmalar yapılmıştır. Her ne kadar, ksenotransplantasyon birçok zorluklar içerse de, önümüzdeki yıllarda transgenik domuzların organ donörleri olmasının mümkün olduğu bilinmektedir.

Transgenik hayvanların başarıyla kullanılabileceği alanlardan bir diğeri de ksenojenik hücre ve dokuların hücre terapi alanında kullanımıdır. Birçok hastalık, bozukluk veya sakatlıkta geri dönüşümsüz hücre ölümleri veya anormal hücresel fonksiyon bozuklukları görülmektedir. İnsan embriyonik kök hücreleri hücre terapisi alanında kaynak olarak kullanılsa da, ksenojenik hücre ve dokuların kullanılması büyük bir umut vaat etmektedir (Edge ve ark., 1998).

Domuz pankreas langerhans adacık hücrelerinin diyabet hastalarına nakli (Groth ve ark., 1994), domuz fötal nöronal hücrelerinin Parkinson ve Huntington hastalarının beyinlerine nakilleri (Deacon ve ark., 1997; Fink ve ark., 2000) başarılı örneklerdendir.

Domuz nöronal hücrelerinin diğer bir başarılı örneği de felç ve fokal epilepsi hastalarına nakilleridir (Björklund, 1991).

Sığır adrenokortikal hücrelerinin, adrenalektomili fareye nakli sonucu adrenal fonksiyonların yeniden kazanıldığının görülmesi, fonksiyonel endokrin dokunun tek bir somatik hücreden türetilebileceğini ortaya koymuştur (Thomas ve ark., 1997). Transgenik fötuslardan elde edilen sığır nöronal hücrelerinin sıçan beynine nakli ile Parkinson hastalığı belirtilerinde düzelme görülmüştür (Zawada ve ark., 1998). Retinal hastalıkların tedavisinde retinal pigment epitelyal hücrelerinin kullanımı, iskemik kalp hastalığının tedavisinde domuz veya sığır fötal kardiyomiyosit veya miyoblastların kullanımı da hücre terapisinde hastalara umut olacak tedavi yöntemleridir. Donör domuzların genetik modifikasyonu için daha etkili protokoller geliştikçe ve yeni güçlü immun baskılayıcı ilaçlar ile ksenojenik hücre terapisinin insan hastalıklarının tedavisinde önemli bir terapötik seçenek olması beklenmektedir (Niemann ve Kues, 2003).

2.4. Transgenik Teknolojide Karşılaşılan Sorunlar

Yaşadığımız her alanda ve uygulanan her teknolojide olduğu gibi transgenik teknoloji uygulamalarında da problemlerle karşılaşılabilmektedir. Gen ifadeleri düzensiz dağılımının elde edilen ürünün üretiminde farklı sonuçlar doğurması, çok yüksek sayıda kopya sayısının entegre olması sonucu yüksek ifade görülmesi, transgenik hayvanlarda olası yan etkiler olarak belirli hastalıkların da beraberinde şekillenmesi, oluşabilecek mutasyonlar sonucu esansiyel biyolojik proseslerin aksaması, elde edilen yavrularda mozaizm oluşması, transgenin Y kromozomuna entegre olması sonucu transgeni sadece erkek yavruların taşıması gibi sorunlar gözlemlenebilmektedir (Wheeler ve ark., 2003).

Transgenik atıklar da, özellikle hayvansal üretim konusunda sorunlar oluşturmaktadır. Günümüzde birçok transgenik hayvan insan gıda tüketimine sunulabilecek olmasına rağmen, marketlerde yer alamamaktır. Domuz ve balıklarda büyümeyi artırmaya yönelik yapılan çalışmalar, insan sağlığı üzerinde görülebilecek negatif etkilere karşı teste tabi tutulmaktadır. Örneğin; birçok balık türünde büyüme hormonu geninin ifadesi ile sağlıklı büyüme artışı elde edilmesine rağmen, balıkların üreme koşulları dikkate alındığında transgenezisin açık sularda yayılmasının engellenmesi üzerine çalışmalar devam etmektedir. Transgenlerin atıklarla doğal yaşama

olası kontrolsüz dağılımı bu hayvanların kullanımında önemli bir engeldir (Muir ve Howard, 1999).

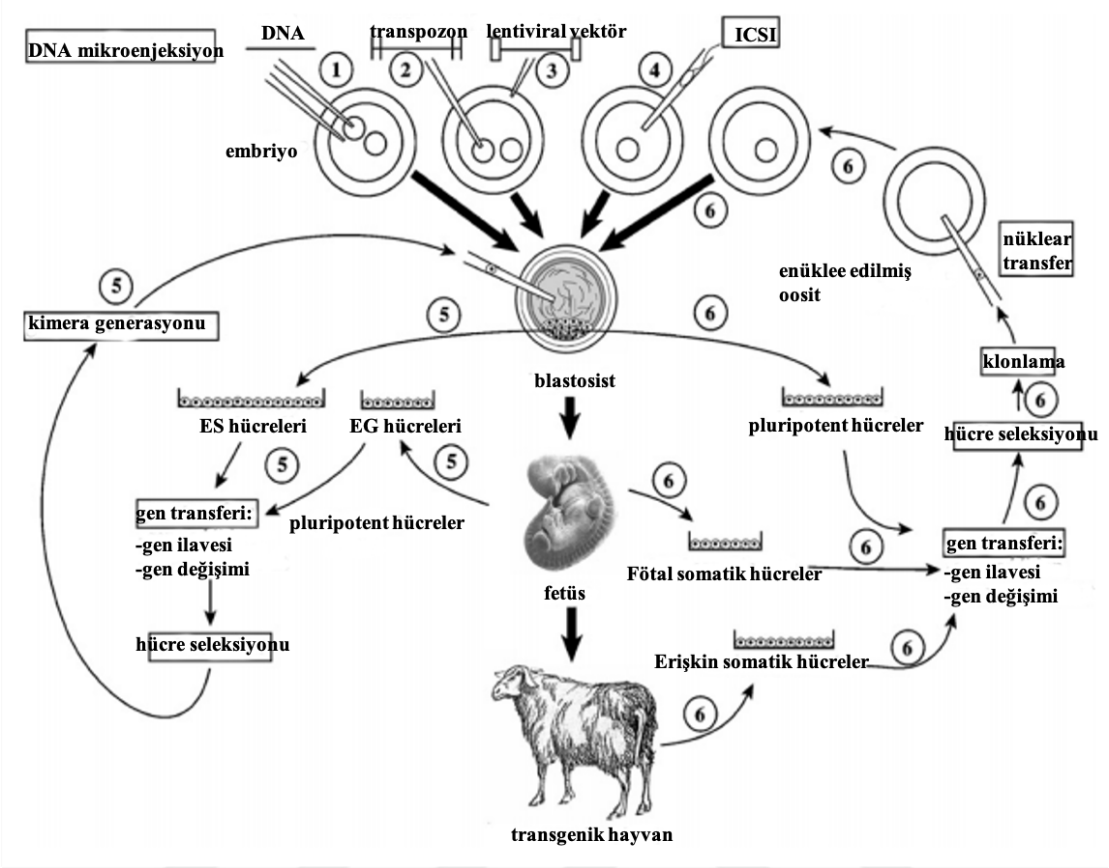
Bunların yanı sıra, çiftlik hayvanları üretiminde transgenezis teknolojisinin kullanımında çok ciddi kaynak ihtiyacının olmasının yanı sıra, bir transgenik hayvan elde etmek için gerekli maliyetler çok yüksektir. Yapılan araştırmalara göre; bir transgenik farenin maliyeti 121 $ iken, bir transgenik domuz 25.000 $, bir transgenik koyun 60.000 $ ve bir transgenik inek 546.000 $'a mal olmaktadır (Wall ve ark., 1992).

2.5. Etik Yaklaşımlar ve Hayvan Refahı

Transgenik hayvan üretimi gelecek için özellikle hayvancılık ve ilaç alanlarında büyük umutlar vaad etmesine ve pek çok yarar sağlamasına karşın ciddi potansiyel riskler de oluşturmaktadır. Salgın hastalıklara çözüm olması için transgenik teknoloji ile aşı üretimlerine her ne kadar olumlu yaklaşılsa da, gıda sektörü gibi insan tüketimine sunulan ürünler bir o kadar tepki toplamaktadır (Wheeler ve ark., 2003). Birçok ülkede hayvan genomları ile çalışmalar sürerken, etik ve hayvan refahı konularını da değerlendirmek adına kurumlar yer almaktadır. Tabii ki transgenik teknolojinin maliyetlerinin yüksek olmasına bağlı olarak üretilen hayvan sayısının azlığı da bu tartışmaları dengede tutmaktadır. Yine de uzun vadede bu alanda yapılan gelişmelerin topluma, çevreye, tüketiciye ve hayvanlara olan etkisi de incelenmeye devam edecektir.

2.6. Transgenik Hayvan Üretimi için Uygulanan Yöntemler

Gen transferi ile çiftlik hayvanlarında genetik manipülasyon yapılabilmesi birçok kolaylık sağlamaktadır. Bu amaçla transgenik hayvan üretimi için kullanılan birçok yöntem vardır (Şekil 2-5; Houdebine, 2009). Kullanılan her yöntemin avantaj ve dezavantajları yıllar boyunca yapılan uygulamalar ile şekillenmiş ve en çok tercih edilen yöntemler belirlenmiştir.



Şekil 2-5. Transgenik hayvan üretimi için farklı yöntemler (Houdebine, 2009).

(1) Mikroenjeksiyon yöntemiyle gen transferi; (2) transpozon aracılığıyla gen transferi; (3) lentiviral vektörler ile gen transferi; (4) sperm aracılığıyla gen transferi; (5) pluripotent hücreler ile gen transferi; (6) klonlama ile gen transferi

2.6.1. Retrovirüsler ve Transpozonlar Aracılığıyla DNA Transferi

Retrovirüsler, kendilerine yüklenen genetik materyali konak canlıya enfeksiyon aracılığıyla taşıyabilen virüslerdir. Memeli hücresi, embriyo ve oositler gibi farklı tiplerde hücrelere yabancı DNA'yı taşıyabilen doğal bir taşıma sistemi olarak rol oynamaktadır (Varmus, 1998). Retrovirüsler ve transpozonlar etkili ve değişken araçlar olduğundan özellikle gen terapisi alanında sıklıkla kullanılmaktadır.

Transpozonlar ve retrovirüslerde, mutasyonla kendi genlerinin geri planda kalması sağlanarak kontrolsüz vektör yayılımı engellenmiş olur ve ilgili genin entegrasyonu için imkan oluşur. Rekombinant transpozonun entegrasyonu için transpozon vektörler transpozaz enzimi geni içeren bir plazmid ile tamamlanmalıdır. Böylece transpozaz geni silinerek yabancı DNA'ya yer açmalı ve rekombinant transpozonun kontrolsüz bir şekilde yayılmasını engellemelidir. Ekzojen transpozazın, rekombinant vektörü tamamlamadığı durumlarda; vektör tek başına genoma entegre olamamaktadır.

Birçok türde, embriyoların sitoplazmasına enjekte edilen yabancı DNA nadiren genoma entegre olabilmektedir. Entegrasyonu artırmak için, konak DNA'da kırılmalar oluşturabilmek adına düşük miktarlarda restriksiyon enzimleri enjekte edilmesi ve böylece DNA'nın kendini onarırken yabancı DNA ile de entegre olması gibi çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Fakat bu yöntemlerin kontrolü zor olmakla birlikte, verilen restriksiyon enzim miktarı ya yetersiz kalmakta ya da konak genomunda geri dönüşümsüz zararlara neden olmaktadır. Bu yöntemlerin yerine, konak genomuna yüksek kapasitede entegre olma imkanı sağlayan retrotranspozonlar ve retroviruslar aracılığıyla transfer yöntemi; meyve sineklerinde (Drosophila) kullanılmaya başlanmış, daha sonra balık, tavuk, memeliler, ipek böceği ve diğer böceklere adapte edilmiştir (Houdebine, 2002). Yapılan bir çalışma ile piggy-Bac transpozonu kullanılarak yeşil floresan proteini (GFP) ekpresyonu gösteren transgenik ipek böcekleri elde edilebilmiştir (Tamura ve ark., 1999). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama anabilim dalında yapılan çalışmalarda da Hawaii Üniversitesi Biyogenez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilmiş olan piggy-Bac transpozonu kullanılarak GFP ifadesi gösteren tavşan (Can ve ark., 2015) ve kuzu (2013, yayınlanmamış çalışma) elde edilmiştir. Diğer yöntemlerin başarısız olduğu alanlarda bu yöntemin etkin olduğu gözlenmiştir. Fakat transpozonların ve retrovirüslerin yabancı genleri taşıyabilmek için sınırlı alanları olması dezavantajlarından biridir.

2.6.2. DNA Mikroenjeksiyon Yöntemi

Direkt olarak DNA'nın mikroenjeksiyon yöntemi ile embriyo pronükleusuna verilmesi memelilerde başarıyla kullanılan ilk tekniktir. Mikroenjeksiyon yönteminde, yabancı bir DNA parçacığı konak canlı olan fertilize edilmiş pronüklear aşamadaki embriyonun pronükleusuna transfer edilir. Bu yöntem özellikle transgenik fare üretiminde yaygın olarak kullanılan en etkili yöntemdir (Gordon ve ark., 1980). Yöntem 1985 yılında tavşan, domuz ve koyunlarda, daha sonraki yıllarda da keçi, sığır ve sıçanlarda uygulanmıştır (Houdebine, 2002). Bu yöntemde mikromanipülatör kullanılarak binlerce DNA kopyası pronükleusa transfer edilir, sonrasında alıcı hayvanların normal gebelik süresi takip edilerek transgenik yavru elde edilmektedir. En çok tercih edilen bu yöntem, güvenilir bir yöntem olmasına karşın %1-4 gibi düşük bir etkinliğe sahiptir. Ayrıca, transfer edilen gen canlıda rastgele dağılım ve değişken anlatım

gösterebilmektedir. Aynı zamanda bu yöntem ile bir transgenik canlı üretimi için gerekli olan yatırım ve malzemeler pahalı olup, ciddi maliyetler gerekmektedir (Niemann ve Kues, 2003). Yöntemin etkinliğinin çiftlik hayvanlarında daha düşük olmasının sebepleri; embriyo manipülasyonunun daha maliyetli olması ve genin entegrasyonunun rastgele dağılım göstermesidir. Yine özellikle çiftlik hayvanlarında pronükleusun görülememesi ve alternatif yöntem olarak fazla miktarda DNA'nın sitoplazmaya enjeksiyonunun gerekliliği de uygulamada karşılaşılan problemlerdendir. Özellikle çiftlik hayvanlarında, farelere kıyasla reprodüksiyon süresinin uzun olması, süperovulasyonla elde edilen embriyo sayısının düşük olması mikroenjeksiyon yönteminin maliyetlerini artırmakta, dolayısıyla az hücre kullanıldığı için başarı şansını olumsuz etkilemektedir.

2.6.3. Embriyonik Kök Hücre Enjeksiyonu

Transgenik teknoloji alanında yapılan araştırmalar doğrultusunda önemli gelişmelerden biri de; embriyo, fetüs ve erişkinlerden embriyonik ve somatik hücrelerin izole edilebilmesi ve bu hücrelerin nüklear transfer yöntemi ile kullanılabilmesidir (Wheeler ve ark., 2003). Embriyonik kök hücre hatları blastosistlerin iç hücre kitlesinden elde edilerek in vitro ortamda geliştirilebilmektedir. Böylece farklı doku tiplerine dönüşebilen identik özellikte sınırsız bir hücre hattı oluşturulabilir (Wheeler, 1994). Embriyonik kök hücrelerin genişlemiş blastosistlere transferi ile iki veya daha fazla farklı genotipte kimerik hayvanlar elde edilebilmektedir (Robertson ve ark., 1986).

Homolog rekombinasyon ile gen değiştirmesi yöntemi bakteri ve mayalarda rutin olarak kullanılmaktadır. Somatik memeli hücrelerinde de uygulanabildiği halde etkinliği düşüktür, fakat pluripotent embriyonik hücrelerde homolog rekombinasyon başarısı daha yüksek olabilmektedir. Spesifik gen inaktivasyonu, hayvan genomunda hedef nokta mutasyonları veya belirli bir geni bağlantısı olmayan bir genle değiştirmesi gibi imkanlar sunabilmesi bu yöntemi cazip hale getirmektedir. Homolog rekombinasyonda hücrelerin seçilme sonrasında canlı embriyo oluşturabilmesi gerektiğinden dolayı, embriyonik kök hücrelerin de kimerik embriyolar oluşturabilmeleri bu özelliği karşılamaktadır. Fakat bu yöntem fare dışındaki diğer türlerde başarısız olmuştur. Bunun sebebi, rekombin embriyonik kök hücrelerin kimerik embriyo gelişiminde yer alma kapasitelerinin yüksek veya düşük olmasına bağlanmaktadır (Smithies, 2001). Homolog rekombinasyon, fare embriyonik kök hücrelerinde belirli bir gen fonksiyonunu elimine etmek ve bu gene ait

boş bir genotip oluşturmak için en basit yöntemdir. Gen hedeflenmesi kullanılarak bu yöntemle fare embriyonik kök hücrelerinde 1000'in üzerinde nakavt suş üretilmiştir.

Son yıllarda gerçekleştirilen bir çalışmada, tavuk kültür primordiyal germ hücrelerinin embriyolara transferi ile bu hücrelerin embriyo gelişimine katıldığı ve genlerini yavruya aktarabildikleri gösterilmiştir (Petitte ve ark., 2002). Diğer bir çalışmada ise, Japon pirinç balığının embriyolarından elde edilen embriyonik kök hücrelerle kimerik hayvanlar oluşturulabildiği ve bu yöntemin balıklarda gen transferi ve gen hedeflemesi için kullanılabileceği görülmüştür (Collodi, 2001).

2.6.4. Sperm Aracılığıyla DNA Transferi

Sperm aracılığıyla gen transferi, yabancı DNA'nın hayvanlara entegre edilerek transgenik hayvan eldesinde kullanılan yöntemlerden birisidir. Çıplak DNA parçacığının spermaya tutunduğu bilinmektedir (Lavitrano ve ark., 1989). Yöntem kısaca, spermanın ejakülasyon yöntemiyle ya da epididimisten elde edilmesi ve yabancı DNA ile belirli sürelerde inkübe edilmesi ile gerçekleşir. Sperm-DNA kompleksi in vitro fertilizasyon (Lavitrano ve ark., 1989) ya da suni tohumlama yöntemi (Gandolfi ve ark., 1996) ile transfer edilebilmektedir. Fakat genellikle bu yöndeki çalışmalar in vitro fertilizasyon üzerine yoğunlaşmaktadır. Sperm aracılığıyla gen transferi yöntemi ile fare (Lavitrano ve ark., 1989), tavşan (Brackett ve ark., 1971), domuz (Gandolfi ve ark., 1989), tavuk (Fainsold ve ark., 1990) ve sığırda (Perez ve ark., 1991) yavru elde edilebilmiştir.

Yöntemin dezavantajları arasında; tekrarlanabilirliğinin düşük olması ve entegre olan DNA'nın ayarlanabilirliğinin zorlukları yer almaktadır. Ayrıca seminal plazmanın yüksek miktarda DNAaz içermesi de, yabancı DNA'nın bu enzimi aktive etmesine neden olmaktadır. Bu durumun da, doğal koşullar altında sperma ile yabancı DNA'nın oosite ulaşmasını engellediği savunulmaktadır (Spadafora, 2002). Son yıllarda yapılan çalışmalar, DNA'nın sperm yüzeyindeki proteinlere hedefli spesifik antikorlara bağlanarak da taşınabildiğini göstermiştir. Bu yöntemle farelerde in vitro fertilizasyon, koyunlarda ve tavuklarda suni tohumlama ve domuzlarda intrauterin enjeksiyon ile başarı sağlanmıştır. Bu yöntemle doğan yavrularda %30'a kadar transgenik yavru gözlenmiştir. İnsan da dahil birçok memeli türünde aynı antikorun aynı antijeni tanıdığı görülmüştür. Yeniden düzenlemeye gerek olmadan yabancı genin bu yöntemle yüksek düzeyde entegrasyonu gözlenmiştir (Houdebine, 2002).

Sperm aracılığıyla gen transferinin etkinliğini artırmak için diğer bir yaklaşım ise intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemidir. Farelerde, intakt ya da membranı bozulmuş spermatozoonların yabancı DNA ile inkübasyonu sonucunda oositlere mikroenjeksiyonu ile elde edilen yavruların %20'sinin yabancı DNA'yı eksprese ettiği gözlenmiştir (Perry ve ark., 1999). ICSI yönteminde bazı türlerde sınırlı başarı gözlense de, transgenik domuzlarda yüksek verim elde edilmiştir (Yong ve ark., 2006).

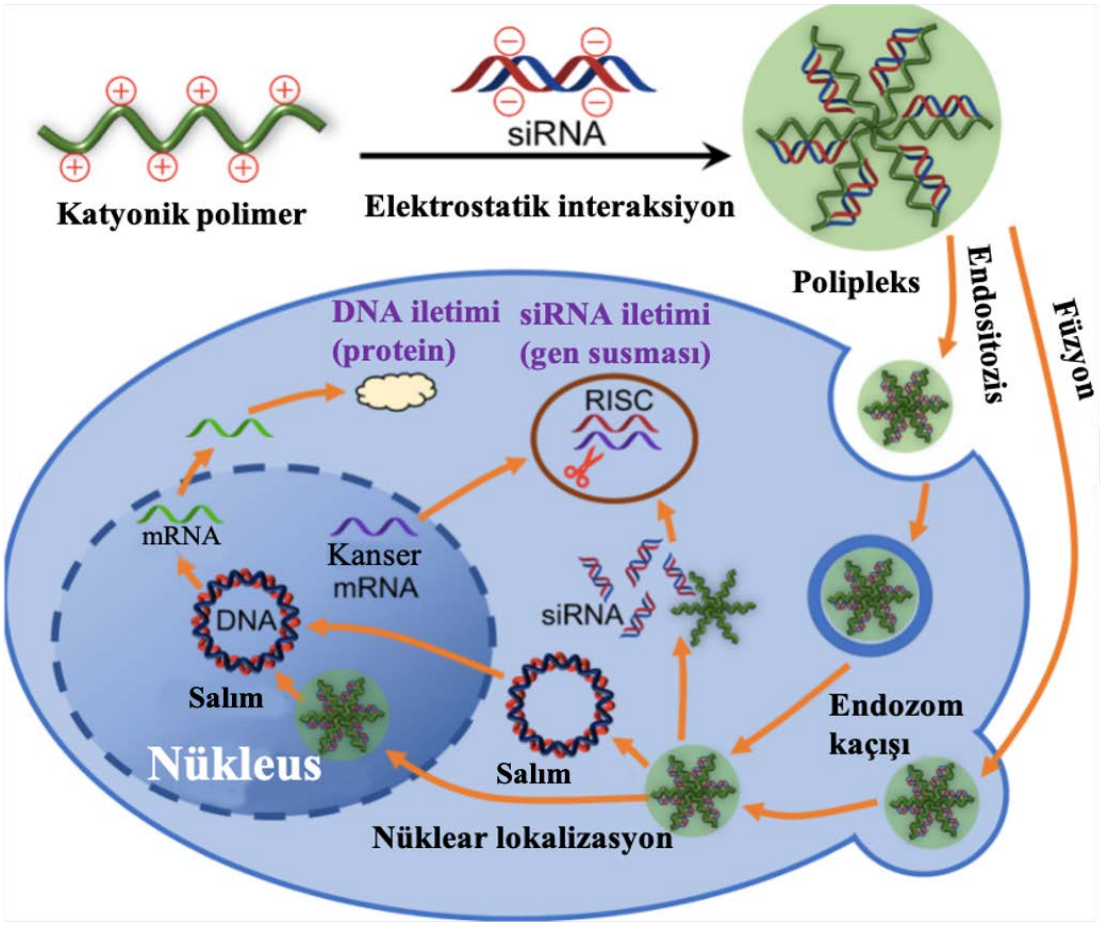
2.6.5. Gen Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemler Aracılığıyla DNA Transferi

Gen transferini sağlayabilmek için kullanılan taşıyıcı sistemler vektör olarak adlandırılmaktadır. Viral vektörler gen transferinde oldukça yüksek oranda başarı sağlamasına karşın klinik uygulama alanında güvenlik sorunları teşkil etmesinden dolayı, polimer, lipozom, lipid veya inorganik esaslı bileşiklerin sentezi gündeme gelmiştir. Transfeksiyon alanında yapılan yeni çalışmalar polimer ve inorganik yapıdaki bu bileşiklerin etkinliğini artırmak ve hücreler üzerindeki toksisiteyi azaltmaya yöneliktir (Luo ve Saltzman, 2003). Polimer ve inorganik yapıdaki vektörler pozitif yüklü olmaları dolayısıyla, negatif yüklü DNA ve hücre membranı ile etkileşime girerek polipleks yapıları oluşturabilme avantajına sahiptirler (Vorhies ve Nemunaitis, 2009; Şekil 2-6, Chen ve ark., 2020).

Lipozomlar aracılığıyla gen transferi, nanopartiküler gen taşıma sistemleri içinde çalışılmakta olan bir yöntemdir. Lipozomlar, membran benzeri yağ katmanlarından oluşan küçük veziküllerdir. Bunlar yabancı DNA parçacığının proteazlar ve DNAazlar tarafından sindirilmesini engeller. Katyonik lipozomlar spontan olarak DNA molekülleriyle bağlanabilmektedir (Felgner ve ark., 1987).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, ilaç, gen gibi biyolojik moleküllerin salınımında katyonik tabakalı yapıya sahip çift tabakalı hidroksit bileşiğinin (LDH) kullanıldığı görülmektedir (Forano, 2013). Ayrıca biyobozunabilir, biyouyumlu, doğal ve toksik olmayan polisakkarit bir yapıya sahip olan Kitosan ve biyo-bozunabilen sentetik polimer yapıdaki poli β-amino ester (PBAE) de bu alanda yer edinmiş bileşiklerdir.

1860'lı yıllarda gündeme gelen nanopartikül teknolojisi, ilaç, biyomalzeme, medikal, enerji ve endüstri gibi birçok alanda hızla yenilikler getirmiştir. Özellikle gen terapi alanında 200 nm'den düşük nanopartiküllerin kullanımı çığır açan bir uygulamadır (Cho ve ark., 2008).



Şekil 2-6. Katyonik polimerlerin yabancı DNA ile oluşturdukları polipleks yapıların gen transferinde hücre içine girmesi (Chen ve ark., 2020).

2.6.6. Elektroporasyon Yöntemi

Elektroporasyon, DNA'nın hücre ve embriyolara aktarılmasında kullanılmaktadır (Reiss ve ark., 1986). Konak hücreler ve embriyolar, gen içeren elektrik akımına karşı yüksek direnç gösteren elektroporasyon solüsyonuna koyulur ve mikrosaniyeler süresince yüksek voltajlı elektrik verilerek hücre membranında ve çekirdek membranında geçici kırılmalar, porlar şekillenir. Oluşan porlardan ortamda bulunan gen çekirdeğe kadar ulaşır ve burada entegrasyon şekillenir. Bu yöntem DNA'nın sperma içine girmesi için de uygulanmış ve ekzojen DNA'nın fertilizasyon sırasında ovuma taşınması sağlanmıştır (Gagne ve ark., 1991). Öztürk'ün 2013 yılında yapmış olduğu tez çalışmasında, koç spermasında elektroporasyon yöntemi başka yöntemler ile karşılaştırılarak çalışılmış ve bu yöntem ile sağlıklı transgenik embriyolar elde edilmiştir. Yine elektroporasyon yöntemiyle DNA'nın fare embriyonik kök hücre hatlarına girmesi

sağlanmış ve bunların blastosiste mikroenjeksiyon ile aktarılması sonucu transgenik fare elde edilmiştir (Camper ve ark., 1995).

2.6.7. Somatik Hücre Nüklear Transfer (SCNT) Yöntemi

2.6.7.1. SCNT Yöntemine Genel Bakış

Donör nükleusun enüklee edilmiş oosite transferi ile embriyonun yeniden yapılandırılması fikri 1938 yılında Spemann tarafından ortaya çıkmıştır (Campbell, 1996). Nüklear transfer yani klonlama teknolojisi, erişkin meme epitel hücrelerinden klon koyun Dolly'nin (Wilmut ve ark., 1997) doğumuyla birlikte de dikkat çekici bir noktaya gelmiştir.

Klonlamanın memelilerde başarı ile uygulanabilirliğinin gösterilmesi ile nesli tehlike altında olan veya tükenmiş olan türlerin kurtarılması ve genetik kaynakların korunması için iyi bir fırsat doğmuştur. Koruma amacı ile nesli tükenmekte olan memelilerin somatik hücrelerinin oluşturulan gen bankalarında dondurularak saklanması ile gelecekte yok olma tehlikesi ile karşılaşıldığında türün geriye kazanılabilmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla ülkemizde de yerli gen kaynaklarının korunması için yerli çiftlik hayvanlarının doku örnekleri oluşturulan bankalarda dondurularak saklanmıştır (Türkhaygen-I). Bu dokulardan Arat ve ark. (2011) yapmış oldukları çalışmada ülkemiz yerli gen kaynağı olan Boz ırk sığırının fibroblast, kıkırdak ve granulosa hücreleri dondurulmuş ve SCNT uygulamasında kullanılarak bu ırkın geriye kazanılabileceği gösterilmiştir.

2.6.7.2. SCNT Yöntemi ile Transgenezis

Klonlama ile bir erişkin canlıdan istenilen özelliklerde binlerce yavru elde edilebilmesi fikri, bu teknolojiyi cazip hale getirmiştir. Çiftlik hayvanlarının somatik hücrelerinde gen hedeflenmesi nüklear transfer yöntemi ile beraber kullanıldığında önemli bir uygulama alanı sunmaktadır (Şekil 2-7; Houdebine, 2002).

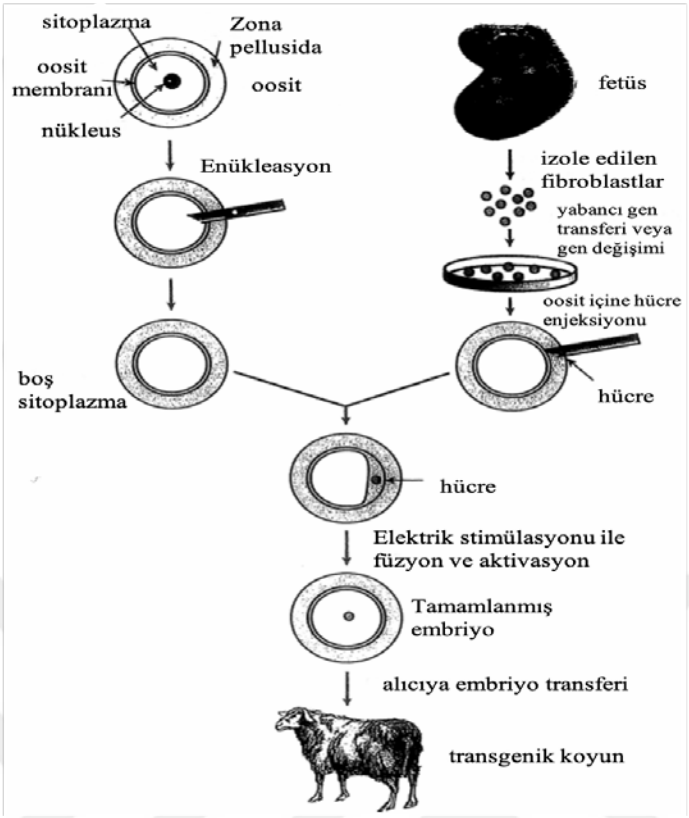
SCNT ile transgenezis, enükle edilmiş bir oositin perivitellin boşluğuna transfekte edilmiş somatik hücrenin transfer edilmesi ve füzyonu ile gerçekleşmektedir (Salamone, 2011). Kısaca bu yöntemde, in vivo ya da in vitro elde edilen oositlerin genetik materyali uzaklaştırılır (enükleasyon). Donör hücreler in vitro ortamda transfekte edilir, transgenin

entegrasyonu gözlendikten ve hücre siklus senkronizasyonu tamamlandıktan sonra enüklee oositin perivitellin aralığına veya sitoplazmasına transfer edilir. Bileşenlerin füzyonundan ve yeniden oluşmuş nüklear transfer kompleksinin aktivasyonundan sonra, sağlıklı embriyonik gelişim gösteren embriyolar senkronize alıcı hayvanlara transfer edilerek sağlıklı yavru elde edilmesi hedeflenir.

İlk transgenik koyunun meme bezinde, kan pıhtılaşma faktörü IX'u eksprese etmesi (Schnieke ve ark., 1997), çiftlik hayvanlarında çalışan hayvan biyoteknolojistlerinin ilgisini çekmiş ve böylece yüksek genetik özellikler taşıyan ve yüksek verimli, genetik olarak modifiye edilebilen bireylerin oluşturulmasına dayalı biyoreaktör oluşturma düşüncesi gündeme gelmiştir (Samiec ve Skrzyszowska, 2011).

Genin nakavt edilmesi (knock out) sonrası somatik hücre kullanılarak farelerde Klonlama yöntemi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Readeout ve ark., 2000). Klonlama tekniği ile gen entegrasyonu yapılmış somatik hücrelerden keçilerde (Reggio ve ark., 2001), ineklerde (Arat ve ark., 2001), domuzlarda (Dai ve ark., 2002) ve tavşanlarda (Chesne ve ark., 2002) başarı ile yavru elde edilmiştir.

Koyunlarda yapılan çalışmalarda, tamamen diferansiye olmuş embriyonik veya fötal hücreler kullanılarak normal hayvanlar oluşturulabilmesinin ardından (Wilmut ve ark., 1997), gen entegrasyonu ile transgenik hayvan elde edilmesini gündeme getirmiştir (Schnieke ve ark., 1997). Koyunlarda gen hedefleme Ayares (1999) ve McCreath ve ark. (2000) tarafından gerçekleşmiştir.



Şekil 2-7. Somatik hücrelerde oluşturulan genetik mutasyonun klonlama tekniği ile aktarımı (Houdebine, 2002).

Donör hücre olarak kullanılan embriyonik ve somatik hücreler gen müdahalesi yapılmasına imkan sağladığından, SCNT yöntemi transgenik hayvan üretilmesi için etkili bir yöntemdir. Mikroenjeksiyon yöntemiyle kıyaslandığında nüklear transfer yönteminde; transgenezisin donör hücre aşamasında görüntülenerek belirlenebilmesi ve yavruda transgenin optimal ifadesinin görülebilmesi, zaman alan transgenik üretimin hızlı görüntüleme ile hızlandırılmasına ve %100 transgenik yavru eldesine imkan sağlamaktadır (Forsberg ve ark., 2001). Yani SCNT ile, en çok arzu edilen ve hedeflenmiş genotipik özelliklere sahip birden fazla aynı hayvanın üretilmesi ile istenilen hedefe ulaşma ciddi oranda hızlandırılabilir. İn vitro kültüre edilmiş donör hücrelerin transfeksiyon sonrasında görüntülenebilmesi ile transgenin genomik DNA katılımı, gen konstraktının kopya sayısı, kromozom bütünleşmesinin gerçekleşmesi gibi önemli noktaların kontrolü yapılarak ortaya koyulması sağlanabilmektedir (Skrzyszowska ve ark., 2008). Bu duruma bağlı olarak seçilim yapılması da doğacak olan yavrunun %100 transgenik olmasını garantilemektedir.

Homolog rekombinasyon, diferansiye olmuş hücrelerde embriyonik hücrelere göre daha düşük başarı şansına sahiptir. Çalışmalarda, fötal fibroblast hücreleri transfeksiyon ile gen entegrasyonunda ve gen hedeflenmesinde homolog rekombinasyon ile kullanılmıştır. Bu hücreler, fötal kaynaklı olsalar bile sınırlı bir hücre döngüsüne sahiptir, bu da homolog rekombinasyonun yer aldığı klon seçilimi için gerekli olan pasaj sayısını etkilemektedir. Neden olduğu bilinmemekle beraber, yetişkin hücrelerin ve uzun sürelerde kültüre edilen hücrelerin nüklear transfer ile klonlamada daha az etkin olduğu görülmüştür. Embriyo gelişimi için esansiyel olan genlerin mutasyonu hayvanlarda ve kültür hücrelerinde devamlı olarak şekillenmektedir. Buna bağlı olarak kromatin yapısı değişebilmekte ve başarılı klonlama şansını etkileyebilmektedir (Houdebine, 2002). Yapılan bir çalışmada ilginç bir şekilde, somatik nüklear transfer ile elde edilen sığır embriyolarının genomunda anormal metilasyon görülmüştür (Kang ve ark., 2001). Bu durum inaktive genlerin yüksek olasılıkla embriyo gelişimi için gerekli olduğunu akla getirmektedir.

2.6.7.3. SCNT Yönteminde Başarıyı Yakalamak

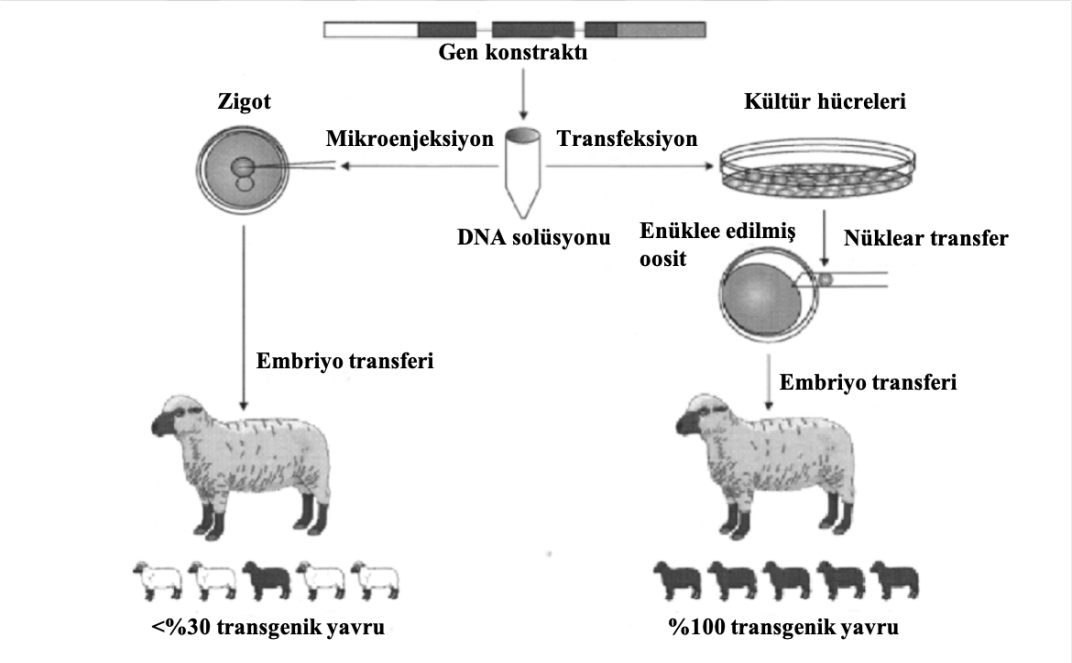
SCNT yönteminin uygulandığı alanlarda son 20 yılda ciddi ilerlemeler kaydedilmesine ve farklı hayvan türlerinden birçok genetik olarak modifiye edilmiş yavru elde edilmesine rağmen genel olarak bakıldığında yöntemin etkinliği hala düşük oranlardadır.

SCNT tekniğinin %1-3 gibi düşük bir başarı oranına sahip olmasının altında; donör nükleus ve alıcı oosit arasında hücre siklusu uyumu, donör hücre tipi ve hücre siklusu senkronizasyonu, totipotensi, nüklear yeniden programlama, oosit aktivasyonu, embriyo kültürü gibi birçok faktör yer almaktadır (Campbell ve ark., 1996). Düşük başarının en önemli sebeplerinden birisi klon embriyo ve fetüslerin düşük yaşama oranlarına sahip olmasıdır (Salamone ve ark., 2012). Klon embriyoların sağlıklı gelişimi, konak oosit ve donör nükleusun hücre döngüsünün koordinasyonunun sağlanması ile normal ploitliğin korunmasına bağlıdır. Metafaz II aşamasında olan oositler konak oosit olarak kullanıldığı takdirde, eğer donör hücre de DNA replikasyonunu bekler konumda (G0/G1) ise normal ploitlik sağlanabilir (Wilmut, 2002).

Yabancı bir genin hücre kültürüne entegre edilmesinde kullanılan yöntemlerin etkinliğinin yüksek düzeyde olması ve kullanılacak hücre hattının önceden gerekli

analizleri yapılarak belirlenebilir olması SCNT yönteminin tercih edilmesinde etkilidir (Schnieke, 1997). SCNT'in öne çıkan avantajları arasında; transgenik hücrelerin belirteç gen kullanımı veya selektif hücre kültürü uygulanarak önceden seçilebilmesi, elde edilecek embriyolarda transgenik etkinliğin %100'e çıkması ve bunun sayesinde mikroenjeksiyon yönteminde karşılaşılan mozaisizm probleminin de önüne geçilmesi sayılabilir (Park, 2002; Baguisi, 1999; Şekil 2-8; Wolf ve ark., 2000).

Transgenik hayvan üretiminde en önemli engel; transgenin taşınmasında kullanılan sistemlerin etkinliğinin iyi bilinmemesi ve transgenin ifade seviyesini optimize edecek mekanizmaların daha iyi kontrol edilememesi olarak gösterilebilir. Özellikle birçok hayvan türünde uygulaması yapılan pronüklear enjeksiyon yönteminde; değişken transgen ifadesi görülmesi ve transgenin transferinin belirsiz olması bu duruma örnek olarak verilebilir (Niemann ve Kues, 2007).



Şekil 2-8. Transgenik hayvan üretiminde DNA mikroenjeksiyonu ve transfekte donör hücreler ile nüklear transfer yöntemlerinin karşılaştırılması (Wolf ve ark., 2000).

SCNT etkinliğinin düşük olması ve halen yaşanan sıkıntıların tam anlamıyla aşılamamış olması bu teknolojide engel teşkil etmektedir (Renard, 2002). SCNT ile üretilen embriyoların çoğu implantasyon sonrası somatik hücrelerin yeniden programlanmasındaki aksaklık veya yetersizliklerin neden olduğu bir takım genetik ve epigenetik kusurlardan dolayı erken embriyonik ölümler nedeniyle kayıplar oluşmakta,

doğumu gerçekleşenlerde ise gelişim anomalilerine ve kısa yaşam süresine sahip oldukları görülebilmektedir (Li, 2003). SCNT'de gözlenen embriyonik kayıpların yanı sıra, yüksek oranda fötal, perinatal ve neonatal kayıplar anormal yavru oluşumu ile de bağlantılıdır (Wilmut, 2002). Bu durum doğal döllenme ile karşılaştırıldığında, transfer edilen hücre nükleusunun yeniden programlanmasından dolayı gelişim için gerekli genlerin ifadesinin yetersiz olduğunu göstermektedir (Li, 2003).

Yapılan birçok çalışma gösteriyor ki, transgenler ve bazen de genler aynı canlı içinde birçok farklı şekillerde kendilerini ifade edebilmektedir. Mozaisizm denilen bu durum, genlerin yakınlarında bulunan retrotranspozonların varlığına bağlanmaktadır. Memeli genomlarında fazla sayıda bulunan retrotranspozonlar, DNA metilasyonu ile inaktive olmaktadır. Embriyonik gelişim sırasında, retrotranspozonlar genler gibi demetile olarak aktive olurlar ve sonra bazıları tekrar metillenir. Transpozonların bu şekilde tekrar metillenmesi, gen ifadelerinin önceden tahmin edilemeyen aktivasyon ve inaktivasyonlarına sebep olmaktadır. Ayrıca yine transpozonların yakınlarındaki genlerin de stimülasyonuna veya baskılanmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bu etkileşimlerin, gen ve transgen ifadelerini etkileyen en belirgin epigenetik mekanizma olduğunu bilinmektedir (Whitelaw ve Martin, 2001; Symer ve Bender, 2001; Rakyan ve ark., 2001).

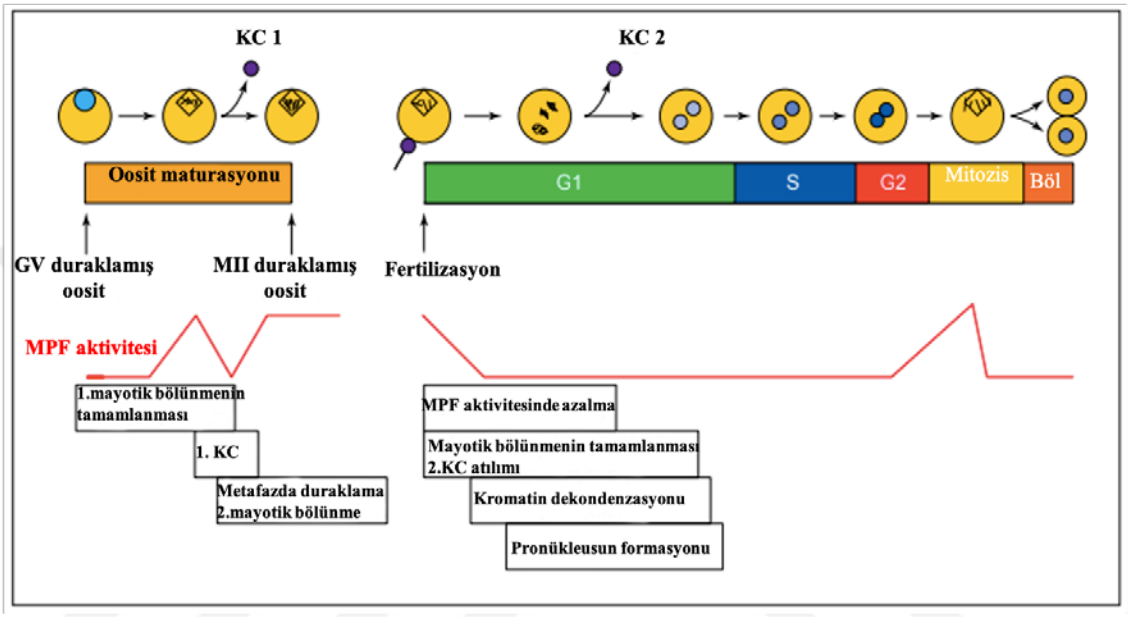
2.6.7.4. SCNT Yönteminde Başarıyı Etkileyen Faktörler

2.6.7.4.1. Konak Hücrenin Sitoplazmik Aktiviteleri

Nüklear transferin ilk önemli aşaması, enüklee oositin (ooplastın) donör nükleusu yeniden programlayabilecek konumda olmasıdır. Bu amaçla genellikle in vivo veya in vitro elde edilen Metafaz II (MII) aşamasındaki oositler kullanılmaktadır. Mezbaha materyalinden elde edilen oositlerin in vitro maturasyonu ile yüzlerce MII oosit elde edilebilmesi bir avantaj sunarken, bazı türlerde ovaryan stimülasyon ve oosit toplanması sonucu elde edilen in vivo mature oositler daha iyi sonuç vermektedir (Wolf ve ark., 2001). İneklerde yapılan bir çalışmada, Metafaz II ooplastların fertilizasyon sonrasında ilerleyen saatler boyunca yeniden programlayabilme kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir (Schurmann ve ark., 2006).

Memeli oositler; ilk mayoz bölünmenin profaz kısmında germinal vezikül aşamasında gelişimsel olarak duraklar, uygun uyarımı aldıkları zaman germinal vezikülün yıkımlanmasıyla ilk mayotik bölünme tamamlanır ve oosit ikinci mayoz

bölünmenin metafaz aşamasında tekrar duraklar. Bu aşamada, oositin fertilize olmasıyla beraber ikinci mayoz bölünme tamamlanır. İkinci kutup cisimciğinin de atılmasıyla, erkek ve dişi kromatin yapıları dekondense olarak iki pronükleusu oluştururlar. DNA replikasyonunun da gerçekleşmesiyle mitoz bölünme şekillenir ve iki blastomerli zigot oluşur (Şekil 2-9; Campbell ve ark., 1996).

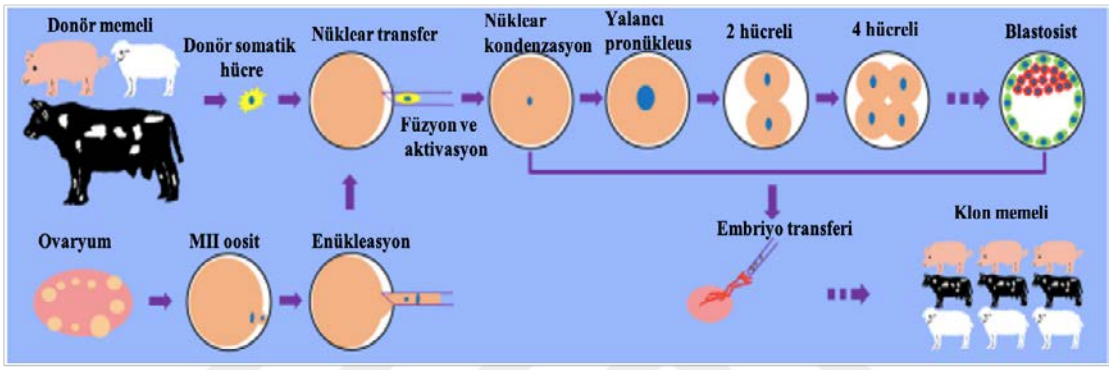


Şekil 2-9. Oosit maturasyonu ve fertilize zigotun ilk hücre siklusu sırasında şekillenen değişimler (Campbell ve ark.,1996)

Oosit sitoplazmasında bu olaylar şekillenirken, maturasyon-mayoz-mitoz ilerletici faktör (MPF) önemli bir rol oynamaktadır. MPF aktivitesi, oositin durakladığı metafaz II aşamasında yüksek değerlerdeyken, fertilizasyon veya aktivasyon sonrasında hızlıca düşüşe geçer. SCNT sırasında ise, sitoplastın içerisine transfer edilen nükleus yüksek MPF aktivitesine sahip olduğunda nüklear zarf yıkımlanır ve kromozom kondenzasyonu şekillenir (Şekil 2-10, Wang ve ark., 2020). Şekil 10'da şematize edildiği gibi; SCNT yönteminde kısaca istenilen donör hayvandan somatik hücreler elde edilir ve primer kültür oluşturulur. Mezbahada kesilen hayvanlardan elde edilen ovaryumlardan oositler elde edilir ve MII oositlere olgunlaştırılır. MII oositler enüklee edilerek, donör hücreler bu oositlerin perivitellin boşluklarına transfer edilir. Hücre-sitoplast komplekslerinin füzyon ve aktivasyonundan sonra, yeniden yapılanmış klon embriyolar gelişmeye başlar, nüklear kondenzasyon ve nüklear büyümenin devamında yalancı pronükleus oluşumu, 2-hücre, 4-hücre ve blastosiste kadar olan diğer gelişim aşamaları

takip eder. Gelişen klon embriyolar alıcı hayvanlara transfer edilir ve canlı klon hayvanlar elde edilir.

Evecen ve ark. (2016) kedilerde yapmış oldukları çalışmada SCNT yönteminde MI ve MII aşamasındaki oositlerin karşılaştırmışlar, füzyon (sırasıyla %21,55 ve %66,66) ve yarıklanma (sırasıyla %11,11 ve %15,75) oranlarında MII oositlerin daha iyi sonuç verdiği, MII oositlerinin morula aşamasına ulaşma oranı %9,58 bulunurken, MI oositlerin 2-4 hücreli aşamada durakladıkları gözlenmiştir.



Şekil 2-10. SCNT yönteminin sistematik olarak açıklaması (Wang ve ark., 2020)

Donör nükleusun kromozom kondenzasyonu alıcı sitoplazması tarafından uyarıldığı için prematür kromozom kondenzasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu durum MPF aktivitesine ve MPF'ye maruz kalınan süre ile ilişkilidir. Bu yüzden de, MII aşamasındaki bir sitoplasta nüklear transfer yapılması sonrasında, hücre siklus aşaması fark etmeksizin tüm nükleusların nüklear zarfları yıkımlanır ve nüklear zarfın yeniden oluşmasıyla DNA sentezi gerçekleşir. Fakat, MPF aktivitesi düşük olduğu sırada transfer gerçekleşirse, nüklear zarf yıkımlanmadığından replikasyon transfer edilen nükleusun hücre siklus aşamasına bağlı hale gelir. Bu durumda, G1 veya S fazındaki nükleusların replikasyona devam ettiği, G2 fazındakilerin ise devam ettiremediği gözlenmiştir. Bu sebeplerden dolayı, MII aşamasındaki oositler sitoplast olarak kullanıldığı zaman transfer edilen nükleusun da G1 fazında olması gerekmektedir (Campbell ve ark., 1993).

2.6.7.4.2. Enükleasyon

Enükleasyon işleminde en önemli ilk bariyer zona pellusidadır. Yapılan çalışmalarda, zona pellusidanın in vitro embriyonik gelişim için gerekli olmadığının

ortaya koyulması ile birlikte enükleasyon öncesinde zona pellusidanın kaldırılmasına yönelik protokoller geliştirilmiştir (Oback ve ark., 2003). Zona pellusidanın kaldırılması sonucunda; oosit ve somatik hücre arasında daha kolay bağlantı kurulduğu ve özellikle füzyon sırasında iki hücre membranının daha başarılı bağlantı sağladığı görülmüştür. Bu yöntem; ineklerde (Oback ve ark., 2003), atlarda (Galli ve ark., 2003), domuzlarda (Lagutina ve ark., 2006) ve farelerde (Ribas ve ark., 2005) başarıyla uygulanmıştır.

Enükleasyon, olgunlaşmış oositten mikromanipülatör aracılığıyla metafaz kromozom setinin uzaklaştırılması işlemidir. Bu amaçla DNA-spesifik florokromlar kullanılarak kromozom setinin UV ışık altında daha iyi görülebilmesi sağlanabilir. Kutup cisimcik, metafaz setini bulmak için işaretleyici olarak kullanılır. MII kromozom seti genellikle kutup cisimciğinin komşuluğunda yer alır. Mikropipet içerisine sitoplastın yaklaşık %10'unu alacak şekilde kromozom seti uzaklaştırılır. Bu işlem sırasında genellikle metafaz seti uzaklaştırılmaya çalışılırken, sitoplastın büyük bir kısmı da alındığında, oositin epigenetik yeniden programlanma kapasitesinde azalmaya ve dolayısıyla sağlıklı gelişimin engellenmesine neden olabilir (Campbell ve ark., 2007).

Bu yöntemler dışında; etoposide (Elsheikh ve ark., 1998), etoposide ve cycloheximide kombinasyonu (Fulka ve ark., 1993) veya etanol ve demecolcine kombinasyonu (Ibanez ve ark., 2003) gibi kimyasal ajanlar kullanılarak da kimyasal enükleasyon yapılabilmektedir. Fakat bu yöntemle hazırlanan konak oositlerde düşük yarıklanma oranları görüldüğü ve geleneksel yöntemle kıyaslandığında embriyo gelişiminin sağlıklı olmadığı gözlenmiştir (Campbell ve ark., 2007).

Ökaryotik hücreler iki farklı genom taşımaktadır; bunlardan biri nükleus içerisinde bulunan DNA (nDNA), diğeri ise mitokondride bulunan maternal DNA'dır (mtDNA). SCNT aşamasında konak hücrenin enükleasyon ile kromozom seti uzaklaştırılsa da mtDNA içeriği bulunduğundan, donör hücrenin transferi ile hem nDNA hem de mtDNA gelir ve sonuçta ortamda iki farklı mtDNA bulunur. Oluşan mitokondriyal heteroplazmi de SCNT başarısını etkileyen potansiyel durumlardan biri olarak değerlendirilmektedir (Evans ve ark., 1999).

2.6.7.4.3. Donör Nükleus

SCNT çalışmalarında, embriyonik, fetal (Campbell ve ark., 1996) ve yetişkin (Wilmut ve ark., 1997) hücre hatları kullanılarak sağlıklı yavru elde edilmesinden sonra

memeli epitel hücreleri (Wilmut ve ark., 1997), ovaryan kumulus hücreleri (Wakayama ve ark., 1998), fibroblastlar (Kasinathan ve ark., 2001), sertoli hücreleri (Ogura ve ark., 2000), lenfositler, doğal öldürücü T hücreleri (Inoue ve ark., 2005), olgunlaşmış B ve T hücreleri, nöral kök hücreler ve miyoblastlar (Gao ve ark., 2003) gibi birçok farklı türde hücre kullanılmıştır. Hücrelerin uzun sürelerde kültüre edilmesinin; ploitliğin, genomik stabilitenin ve translasyon sonrasında histon modifikasyonlarının aksamasına, dolayısıyla klonlama etkinliğinin azalmasına neden olduğu bilinmektedir (Jang ve ark., 2004).

Mitotik hücre siklusu 4 fazdan meydana gelir; DNA sentezinin öncesinde mitoz bölünmenin kararının verildiği dönem (G1 fazı), DNA sentezinin gerçekleştiği dönem (S fazı), DNA sentezi ve mitoz bölünmenin arasında kalan dönem (G2 fazı) ve mitoz bölünmenin tamamlanarak genetik materyalin iki kardeş hücreye bölündüğü dönem (M fazı).

G1 fazı, hücre siklusunun en önemli fazıdır. Hücrenin mitoz bölünme geçirme kararı ve S fazına geçişin kontrolünü sağlar. G1 fazındaki duraklama G0 fazı olarak adlandırılır ve hücrenin aktif olmayan sakin halidir. Bu aşamadaki hücreler canlılıklarını korumak için metabolizmalarını azaltırlar. Hücrenin bu sakin fazının, gen ifadelerini kontrol eden kromatinin konak oositin maternal sitoplazmik faktörlerine daha iyi cevap vermesine olanak sağladığı düşünülmektedir (Campbell, 1999).

Donör nükleus ve alıcı sitoplazması arasındaki hücre siklus senkronizasyonu başarı için en önemli aşamalardan biridir (Campbell ve ark., 1996). Sitoplastın metafaz aşamasında ve donör nükleusun G0 veya G1 aşamasında bulunması gereklidir. Donör nükleus senkronizasyonu için serum açlığına bırakma, kontakt inhibisyon, kimyasal ajanlar gibi farklı metodlar kullanılarak, donör hücrelerin aktif hücre siklusundan çıkıp G0 fazı olarak bilinen sakin faza geçmesi sağlanır.

Daha önce de bahsedildiği gibi, nüklear transfer sırasında MPF aktivitesi yüksek ise, nüklear zarf yıkımlanması ve kromozom kondenzasyonu şekillenir. Bu yüzden, embriyonun yeniden yapılandırılması sırasında iki yöntem uygulanır. Bunlardan birincisi; MPF aktivitesi yüksek MII konak oosite G1 fazındaki donör nükleusun transfer edilmesi, ikincisi ise konak oositin aktivasyonu ve MPF aktivitesinin ortadan kalkması ile donör nükleusun herhangi bir fazda transfer edilmesidir (Campbell, 1999).

2.6.7.4.4. Füzyon ve Aktivasyon

Yeniden yapılandırılan embriyonun yapay olarak aktivasyonunun sağlanması SCNT sonrası embriyo gelişimi için çok önemlidir. Fertilizasyon sırasında, spermanın oositle birleşmesinden sonra intraselüler Ca+2 stokları salınır ve mayotik duraklamanın devam etmesine sebep olarak embriyo gelişimine devam eder. Bu amaçla, sığır ve koyunlarda kalsiyum ionofor veya elektrik darbeleri ile geçici bir kalsiyum salınımı oluşturulur ve devamında fosforilazyon veya protein sentez inhibitörü uygulanır (Campbell ve ark., 2007). İntraselüler Ca+2 artışı, Ca+2 içerikli medyum kullanılarak oositlere yüksek voltajlı DC elektrik darbeleri verilmesiyle gerçekleştirilebilir (Zimmerman ve Vienken, 1982). Elektrik darbeleri ile plazma membranında porlar şekillenir ve bu durum hem iki hücrenin füzyonuna hem de Ca+2 akışıyla oositin aktive olmasına neden olur (Machaty ve ark., 1999).

İonomisin veya kalsiyum ionoforun, 6-dimetilaminopurin (6-DMAP) veya siklohekzimit (CHX) ile kombine olarak kullanılması, nüklear transfer sonrasında aktivasyon amaçlı kullanılan en yaygın protokollerden biridir (Akagi ve ark., 2003; Loi ve ark., 1998). İonomisin, intrasellüler Ca+2 stoklarını doğal olarak gerçekleşen tekrarlı salımların aksine tek bir kalsiyum salımı yapması için harekete geçirir. Kalsiyum, MPF aktivitesini baskılar ve devamında kullanılan 6-DMAP (serin proteaz inhibitörü) veya CHX (protein sentez inhibitörü) de MPF aktivitesini baskılamaya devam ederek yeniden oluşumunu engeller. Loi ve ark. (1998) koyunlarda yaptıkları çalışma ile kimyasal aktivasyonun elektrik aktivasyonuna göre daha yüksek oranda pronüklear formasyona neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Susko-Parris ve ark. 1994 yılında yapmış oldukları bir çalışma ile kimyasal aktivasyonda 6-DMAP kullanılmasının, yapay aktive edilen oositlerin metafaz II'den interfaz benzeri yapıya direkt geçiş yapmasına neden olduğunu ve ayrıca nüklear zarfın yıkımlanmasında rol oynayan kinazların engellenmesine yol açtığını ortaya koymuştur. Bu iki önemli neden sonucunda, 6-DMAP ile nüklear zarfın yıkımlanmasının engellenmesi ve dolayısıyla senkronize olmayan embriyonik nükleus ile yeniden yapılandırılmış oositlerde oluşabilecek DNA hasarının da engellenmesi sağlanabilmektedir (Loi ve ark., 2013).

2.6.7.4.5. Epigenetik Yeniden Programlama

Günümüzde, 20'den fazla farklı hayvan türü klonlanmasına rağmen, SCNT yönteminin başarısına bakıldığında klon embriyoların canlı yavruya gelişim oranı %1-3 civarındadır. Klonlama sonrası embriyo kayıpları; erken dönem implantasyon, implantasyon sonrası, prenatal gelişim evresi ve postnatal gelişim evresi olmak üzere 4 aşamada görülebilmektedir. Bu kayıplar genel olarak; mikromanipülasyon sonucu travma oluşması, konak oositin sitoplazmik yetersizliği, in vitro kültür kaynaklı gelişim anomalileri ve donör nükleusun başarısız epigenetik yeniden programlanması kaynaklı olmaktadır (Long ve ark., 2014).

Yeniden yapılandırılan SCNT embriyolarının sadece belirli bir yüzdesinin doğumla sonuçlanabilmesine rağmen, gelişimsel anomalilerinin en önemli sebebinin epigenetik programlamadaki başarısızlık olduğu görülmektedir. Bunlardan en önemlisi, somatik nükleus ile ilişkili olan epigenetik işaretlerinin silinmesinin yetersizliğidir. Epigenetik işaretlerin silinmesi; kimyasal ajanlar, spesifik enzimlerin transferi, donör hücre popülasyonlarının genetik modifikasyonu veya diğer hücre çeşitlerinden sitoplazmik ekstraktların kullanımı gibi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir (Campbell ve ark., 2007).

2.6.7.4.5.1. Donör Nükleusun Yeniden Modellenmesi ve Programlanması

SCNT yönteminin başarılı olabilmesi için; donör nükleusun yeniden modellenerek bir zigotun nükleusunu andırması ve oosit sitoplazmasının da bu modellenmeyi gerçekleştirebilmesi için MII aşamasında duraklaması gerekmektedir. Kromatin yapısındaki bu değişime nüklear yeniden modelleme denilirken, ortaya çıkan yapısal değişikliklere de yeniden programlama denilmektedir (Whitworth ve ark., 2010).

Türe özgü olarak hücre aşaması değişmekle beraber, embriyo büyük miktarlarda RNA üretmeye başlar. Bu transkripsiyon işleminin gerçekleşmesine embriyonik genom aktivasyonu denilmektedir. Embriyonik genomun aktivasyonu; farede 2 hücreli aşamada (Latham, 1999), insanda (Braude ve ark., 1988), sıçanda (Zernicka-Goetz, 1994) ve domuzda (Jarrell ve ark., 1991) 4 hücreli aşamada ve koyun ile sığırda (Telford ve ark., 1990) 8-16 hücreli aşamada gerçekleşir. Bu aşamadan sonra nükleus, embriyonun gelişimini tamamen kontrol etmeye başlar. Memeli embriyosu ilk yarıklanmaları geçirip,

embriyonik genom şekillendikten sonra nükleusun protein yapısı da değişmeye başlar (Whitworth ve ark., 2010).

SCNT ile yeniden yapılandırılmış bir embriyonun sağlıklı gelişimine devam edebilmesi için, oosit kaynaklı faktörlerin donör hücrenin transkripsiyonel durumunu silmesi ve transfer edilen kromatin yapının embriyonik aşamaya dönüştürülmesi gerekmektedir. Bu durumun gerçekleşebilmesi için; hem oosit sitoplazmasının gerekli transkripsiyon faktörlerini içermesi hem de donör hücrenin kromatin yapısının değişime adapte olabilecek konumda olması gerekmektedir (Long ve ark., 2014). Wakayama ve ark.'nın (1998) farelerde yapmış olduğu çalışmada kumulus ve fibroblast hücrelerinin yeniden programlanmaya diğer hücrelere göre daha yatkın olduğu görülmüştür.

Somatik hücre nükleusunun yeniden programlanabilmesi için bazı kritik aşamalardan geçilmelidir. Bu aşamalar; donör nükleusun transkripsiyonunun susturulması, differansiye hücresel hafızanın silinmesi, yeniden yapılanan tek hücreli embriyonun uygun aktivasyonu ve ileri aşamalarda uygun gen ifadelerinin gerçekleşmesidir. Bütün bu aşamalar, bir seri karmaşık epigenetik değişikliklerden meydana gelmektedir. Başarılı bir nüklear yeniden programlamada, kromatin değişiklikleri, histonların kovalent modifikasyonları ve DNA metilasyonu önemli müdahale noktalarıdır (Dean, 2003).

2.6.7.4.5.1.1. DNA Metilasyonu ve Histon Asetilasyonu

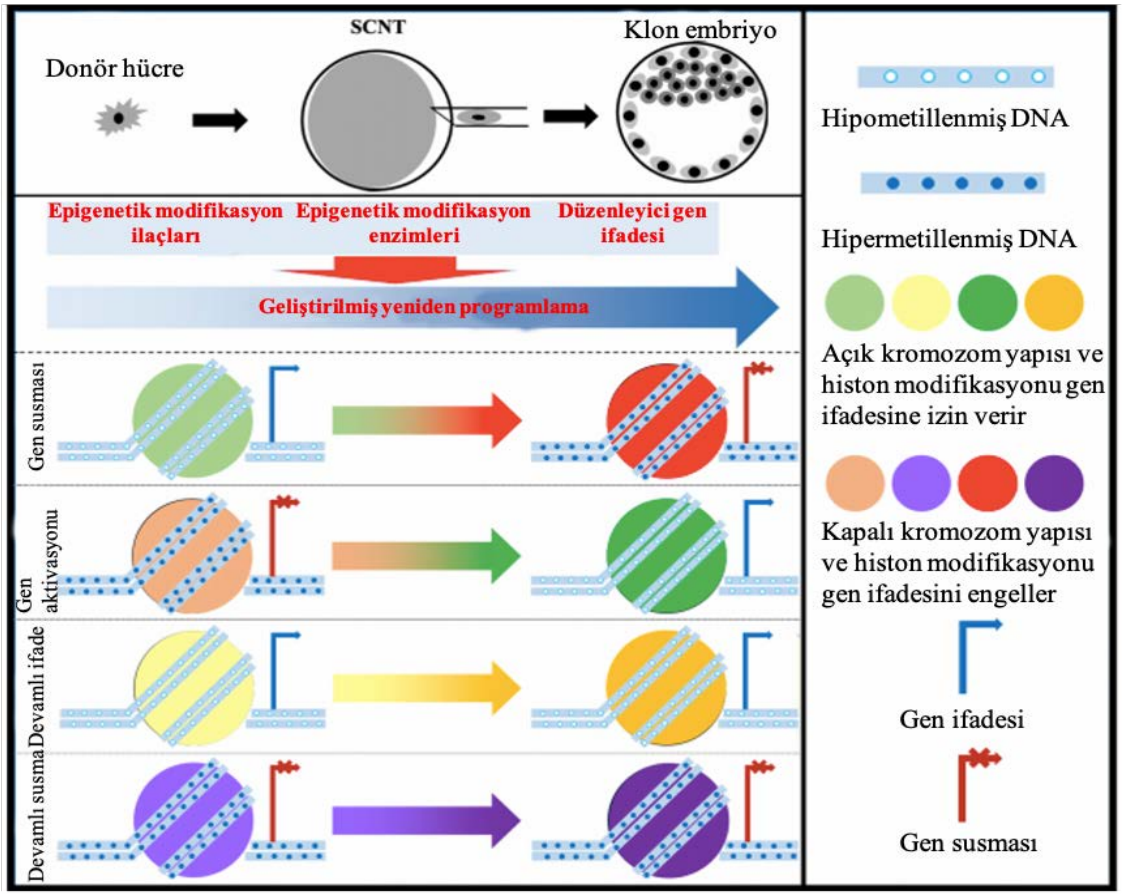
Erken dönem embriyolar normal gelişim sürecinde; embriyonik gen ifadesini etkileyen, iyi organize edilmiş bir DNA metilasyon ve histon modifikasyonu değişiklikleri geçirirler (Yao ve ark., 2012). İmplantasyon öncesi gelişimin ilk birkaç günü, embriyonik epigenomun oluşumu için en kritik aşamadır. Embriyonik epigenomun oluşumu, bütün memeli türlerinde sağlıklı embriyonik gelişim için gereklidir (Armstrong ve ark., 2006). Normal gelişim sürecinde, ooplazma histon asetilasyonu veya DNA demetilasyonu gibi yeniden programlama mekanizmaları içerir ve sperm ile oosit nükleuslarının totipotent duruma geçmesini sağlar. Bu durum, SCNT yapılan oositin somatik hücre nükleusunu yeniden programlama kapasitesinin olduğunu göstermektedir (Ogura ve ark., 2013). Fakat oosit sitoplazması haploid yapıdaki sperm hücresi ile yeniden programlamaya uygundur. Bunun sonucunda, aslında ooplazmanın somatik hücre nükleusunu programlamak için yetersiz olmadığı fakat mekanizmanın çok güçlü

gelebileceği düşünüldüğünden, histon asetilasyon inhibitörü gibi aracılar kullanılarak bazı mekanizmaların engellenmesi sağlandığında başarıya ulaşıldığı gözlenmiştir (Ogura ve ark., 2013). Genele bakıldığında, SCNT embriyo kayıplarının öncelikli sebebinin somatik hücre nükleusunun epigenetik yeniden programlanmasında yaşanılan problemler olduğu düşünülmektedir (Long ve ark., 2014).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu nüklear yeniden programlamada en önemli iki epigenetik düzenleme mekanizması olarak görülmektedir. Fertilizasyon ve blastosist oluşumu sırasında şekillenen bu mekanizmalar nüklear transferde yetersiz programlama sonucu görülen gelişim anomalilerine ve düşük doğum oranlarına sebep olabilmektedir. Bu mekanizmalarda oluşabilecek genetik anomaliler başarı şansını etkilemektedir (Baguisi, 1999; Dean, 2001). Yapılan bir çalışmada, klon sığır ve koyun blastosistlerinin yaklaşık %50'sinde DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunda önemli derecede hatalar görüldüğü ortaya koyulmuştur (Armstrong, 2006). Memelilerde CpG dinükleotidlerinde sitozinin simetrik metilasyonu en çok öne çıkan epigenetik değişikliklerdendir (Santos, 2004). Genin metillenme düzeyi ile ifade derecesi arasında ters ilişki vardır. Yüksek düzeyde gen ifadesi düşük metillenme, düşük düzeydeki gen ifadesi ise yüksek metillenme ile ilişkilidir.

DNA metilasyonu, embriyo ve fetüs gelişiminde önemli bir etkendir. Normal yaşam döngüsünde, genom DNA demetilasyonu ve remetilasyonu gibi bir seri metilasyon aşamaları geçirir ve böylece canlının büyümesi ve gelişimi için gerekli olan genler aktifleşir ya da suskun konuma geçer. Fertilizasyon sonrasında, genom bir seri aktif ve pasif metilasyon geçirir ve sonucunda paternal genomik DNA aktif demetile konuma geçerken maternal genomik DNA pasif demetile haldedir. Fertilize embriyolar blastosist aşamasına geliştiği zaman genomik DNA tekrar remetile hale gelir. Klon embriyolarda, donör somatik hücrelerin genomik DNA'ları yüksek düzeyde metillenmiş haldedir ve gelişim süresinin normal olarak devam edebilmesi için yeniden programlama gerekmektedir (Şekil 2-11, Wang ve ark., 2020). Epigenetik modifikasyon ajanları, enzim regülasyonları ve ilgili genler klon embriyolardaki DNA metilasyonu, kromozom yapısı, histon modifikasyonu, genomik işaretleme ve X inaktivasyonu gibi mekanizmalarda değişiklikler oluşturarak normal fertilize embriyolara benzemelerine imkan sağlar. Genleri aktifleştirmek veya suskun hale getirmek için hedefli epigenetik yeniden programlama sayesinde klon embriyolarda yüksek gelişim oranları sağlanabilir. Genomik

DNA, SCNT sırasında da metilasyon değişikliklerine uğrar, fakat bu eksik global demetilasyon ve anormal remetilasyon şeklindedir. Sağlıklı embriyoların geçirdiği demetilasyon dalgası sağlanamadığından dolayı, somatik hücrenin yeniden programlanmasındaki başarısızlığın SCNT embriyo kayıplarındaki asıl sebep olarak görülmesine neden olmaktadır (Reik ve ark., 2001). Erken embriyonik dönemde, somatik nükleusta görülen hipermetilasyonun aksine hipometilasyon görülmektedir.



Şekil 2-11. SCNT sırasında epigenetik yeniden programlamayı geliştirmeye yönelik şema. (Wang ve ark.,2020).

Klon embriyoların gelişim aksaklıklarına neden olan bir diğer önemli mekanizma da X inaktivasyonunda yaşanılan aksaklıklara bağlıdır. Memeli dişilerde iki X kromozomu bulunurken, erkeklerde bir X kromozomu bulunmaktadır. Gen miktarının dengelenebilmesi için, dişilerde bir X kromozomu Xist geninin aktivitesi ile susturulur. Memeli dişilerin normal embriyonik gelişimlerinde, iki X kromozomu da aktif iken, blastosist aşamasında XCI şekillenir ve iç hücre kitlesinde rastgele bir X kromozomu inaktif hale geçer. Paternal X kromozomu ise, trofoblast hücrelerinde inaktive olur. SCNT

sırasında ise, dişi donör hücrelerdeki inaktive X kromozomu erken dönem klon embriyolarında tekrar aktive olur. Blastosist aşamasında XCI şekillenmesine rağmen, klon embriyolardaki Xist geninin DNA metilasyon seviyesinin fertilize embriyolardan daha düşük olmasına bağlı olarak anormal XCI şekillenir. Ölü klon hayvanların karkas ve plasentaları incelendiğinde anormal XCI modeli gözlenmiş ve bu durumun gelişimi önemli düzeyde etkilediği ortaya koyulmuştur (Xue ve ark., 2002).

Histon modifikasyonları da hücrelerin transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Histon asetilasyonu, kalıtsal bir epigenetik modifikasyondur. Histon kodu direkt olarak transkripsiyonel aktivasyon ile bağlantılı bir epigenetik işaretleyici olarak rol oynamaktadır. Amino asit kalıntılarında yükselen histon asetilasyon seviyelerinin, kromozom yapısının gevşek olmasına bağlı olarak nükleozomun DNA'ya daha gevşek bağlanmasına ve böylece transkripsiyonel olarak serbest bir duruma girmesine neden olur (Zlatanova ve ark., 2000).

2.6.7.4.5.1.2. Donör Nükleusun Yeniden Programlanmasında Kullanılan Yöntemler

SCNT ile elde edilen embriyolarda kromozomal hasarın en aza indirilmesi ve anormal ploitliğin önüne geçilebilmesi için donör hücrelerin yeniden programlanması gerekmektedir. Yeniden programlama amacıyla çalışılan birçok stratejiden en yaygın olanı hücrelerin G0/G1 hücre siklusu fazında durdurulmalarının sağlanmasıdır. Dinlenme evresi de denilen G0/G1 hücre siklus fazındaki hücreler, transkripsiyonel aktiviteleri ve kromatin modifikasyonlarındaki azalmaya bağlı olarak epigenetik müdahalelere daha açık haldedirler. Ayrıca dinlenme fazındaki hücrelerin histon metilasyon seviyelerinin daha düşük olmasına bağlı olarak da programlamaya daha yatkın oldukları düşünülmektedir (Armstrong ve ark., 2006).

Hücre siklusu senkronizasyonu aşamasında somatik hücrelerde; metilasyon düzeylerinde hipermetilasyon gibi farklılıklar, yaşlanma, apoptoz gibi komplikasyonlarla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Son zamanlarda bazı inhibitörlerin hücre siklusunun ayarlanmasında başarılı sonuçlar verebildiği gözlenmiştir. Hücreleri serum açlığına bırakma, kontakt inhibisyon, kimyasal hücre siklusu inhibitörleri gibi yöntemler programlama amacıyla kullanılan yöntemlerdendir.

2.6.7.4.5.1.2.1. Kontakt İnhibisyon

Yöntemlerin içinde en yaygın kullanılan, hücrelerde uzun süreli kültür ortamı oluşturularak konfluensinin sağlandığı kontakt inhibisyon yöntemidir. Yayılım gösteren hücreler birbirleriyle kontakt konumuna geldiğinde hücre yapısında değişiklikler şekillenir ve hücre bölünmeleri aksar veya durur. Farklı hücre tipleri ve hayvanlarda çalışılmış olan bu yöntem en etkili yöntemlerden biridir (Boquest ve ark., 1999; Holker ve ark., 2005; Suzuki ve ark., 2000).

2.6.7.4.5.1.2.2. Serum Açlığına Bırakma

Sık kullanılan yöntemlerden biri de serum açlığına bırakma şeklindedir. Ancak, açlığa bırakma yönteminin yapılan araştırmalar sonucunda hücrelerde DNA fragmentasyonu, mitokondriyal bozulma, apoptoz veya hücre ölümlerine, hücre siklusunun devamlılığında aksamalar ve bozukluklara neden olduğu görülmüştür (Liliensiek, 2006). Yöntemdeki en önemli sıkıntı hücrelerin ya G1 fazında duraksaması ya da apoptoza gitmesidir (Boquest ve ark.,1999). Buna rağmen açlığa bırakma yöntemi kullanılarak farklı hücre tipleriyle ve farklı hayvanlarda çalışılmış ve sağlıklı embriyo gelişimi gözlenmiştir (Campbell ve ark., 1996; Cho ve ark., 2002; Lee ve ark., 2005; Wilmut ve ark., 2007).

Birler ve ark. (2010) koyunlarda yapmış oldukları çalışmada serum açlığına bırakılmış kumulus hücreleri kullanılarak SCNT yöntemi ile elde edilen erken dönem embriyolar, alıcı koyunlara transfer edilmesi ile iki canlı klon yavru elde edilmiştir. Demir ve ark. (2019) Kıvırcık koyun ırklarında donör hücre senkronizasyonu için kumulus hücrelerinde serum açlığına bırakma yöntemi ve oosit aktivasyonu için ionomisin uygulamaları denenmiş, çalışmanın sonucunda kumulus hücrelerini serum açlığına bırakmaya gerek olmadığını belirtmişlerdir.

2.6.7.4.5.1.2.3. Kimyasal İnhibitörler

Yeniden programlama amacıyla kullanılan bir yöntem de histon deasetilaz inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Trichostatin A ve Scriptaid asetillenmiş histon havuzunu artırabilen histon deasetilaz inhibitörlerindendir (Kishigami ve ark., 2006). Deasetilazların inhibisyonu, histonların global asetilasyonunda artışa neden olur. Böylece

kromatin yapısında değişiklikler meydana gelerek, RNA polimeraz gibi proteinlerin DNA'ya ulaşmasına ve transkripsiyonun başlamasına sebep olur (Whitworth ve ark., 2010). Trichostatin A uygulamasının, klon embriyoların blastosist aşamasına ulaşmasında da etkili olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2008). Trichostatin A ile yapılan çalışmalarda, farelerde klonlama etkinliğini arttırdığı görülürken (Kishigami ve ark., 2006) tavşan (Meng ve ark.,2009) ve domuzlarda (Zhao ve ark., 2010) neonatal ölümlere neden olduğu belirtilmiştir.

Histon asetilasyonunun değiştirilmesi dışında, DNA metilasyon mekanizması da değiştirilerek hücrelerde yeniden programlama yapılabilmektedir. DNA metilasyon inhibitörü olarak en yaygın kullanılan kimyasal inhibitör 5-aza-20-deoksitidindir (5-aza-dC). Bu inhibitör, donör hücrelerde DNA metilasyonunda azalmaya neden olur (Whitworth ve ark., 2010). Trichostatin A ile 5-aza-dC'nin sığır donör hücrelerinde ve embriyolarında beraber kullanılması sonucunda, artan histon asetilasyonu, azalan DNA metilasyonu ve blastosist gelişiminde artış gözlenmiştir (Ding ve ark., 2008).

Yine programlama amacıyla kullanılan diğer bir grup ise hücre siklus inhibitörleridir. Bunlardan biri olan Aphidicolin, hücre siklusunu G1/S fazı geçişinde duraklatabilen bir memeli DNA polimeraz inhibitörüdür. Butyrolactone I ise siklin bağımlı kinaz (Cdk) ailesine özgü spesifik bir inhibitördür. Direkt olarak Cdk'ları inhibe ederek, hücre siklusunun G1/S fazı geçişinde ya da G2/M fazı geçişinde duraklatır. Diğer bir inhibitör ajanı Roscovitine ise, spesifik olarak Cdk 2 ve MPF'leri inhibe ederek, hücre siklusunun G0/G1 fazında duraklamasını sağlar (Cho ve ark., 2005; Koo ve ark., 2009; Park ve ark., 2010; Sun ve ark., 2008).

Sunulan çalışmada, transgenik teknoloji ve gen terapisinde önemli bir yere sahip olan gen taşıyıcı nanopartiküller sistemlerden poli β-amino ester (PBAE), çift tabakalı hidroksit bileşiği (LDH), modifiye kitosan (mChi) polimerlerinin koyun primer erişkin (PKF) ve embriyonik (PKEF) fibroblast hücrelerinde transgenik etkinlikleri, apoptotik aktivite ve membran bütünlüğü üzerindeki etkileri ticari ürün Lipofectamine® ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Elde edilen bu transgenik PKF ve PKEF hücre hatlarının SCNT'de kullanıma yönelik kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma, Roscovitine ve Trichostatin A inhibitörlerinin hücre siklusu senkronizasyonu, apoptotik aktivite ile SCNT başarısı üzerinde etkili olduğu savunulan DNA metilasyon seviyeleri üzerinde etkisi ilk kez karşılaştırmalı olarak ortaya koyulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılacak Materyal

Materyal olarak İstanbul Tuzla ilçesinde özel bir işletmeye ait (Elif Et Kombinası) mezbahada kesilen erişkin koyunun kulak dokusundan elde edilen fibroblast hücre kültürü ve yine mezbahada rastlantısal olarak kesilmiş 45-60 günlük gebe koyundan alınan fetüsten elde edilen embriyonik fibroblast hücre kültürü kullanılmıştır.

Bu çalışmanın yapılabilmesi için, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30.06.2016 tarihli 2016/33 sayılı yazısı ile gerekli etik kurul onayı alınmıştır.

Sunulan tezdeki çalışmalar, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı'nın Laboratuvarları ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda bulunan İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferi Laboratuvarında yapılmıştır .

3.2. Fibroblast Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

3.2.1. Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurulmasında Kullanılan Medyumlar

Tablo 3-1. Stok hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
NaCl	800 mg
KCl	20 mg
KH_2PO4	20 mg
NaH_2PO4	115 mg
$CaCl_2.2H2O$	13,3 mg
$MgCl_2.6H2O$	10 mg
Embriyoda Test Edilmiş Su	100 mL

Tablo 3-2. %1 antibiyotikli hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
Stok Hücre Kültür PBS	800 mg
D-glikoz	100 mg
Na piruvat	3,6 mg
BSA / FCS	400 mg / 10 mL
Penisilin	6 mg (90 IU/mL)
Streptomisin	5 mg
Embriyoda Test Edilmiş Su	100 mL

Tablo 3-3. %10 antibiyotik ilaveli hücre kültür PBS medyumunun hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
Stok Hücre Kültür PBS	100 mL
D-glikoz	100 mg
Na piruvat	3,6 mg
BSA / FCS	400 mg / 10 mL
Penisilin	60 mg
Streptomisin	50 mg

Tablo 3-4. Stok Hücre kültür medyumunun (HKM) hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
DMEM yüksek glikoz	1,34 g
Sodyum Bikarbonat	370 mg
Penisilin	6 mg (90 IU/mL)
Streptomisin	10 mg
Distile Su	100 mL

Tablo 3-5. %10 FCS ilaveli HKM hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
HKM stok	98 mL
FCS	10 mL
L-glutamin	29,2 mg
Sodyum piruvat	11 mg
MEM non-esansiyel amino asit	1 mL

Tablo 3-6. %20 FCS ilaveli HKM hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
HKM STOK	79 mL
FCS	20 mL
L-glutamin	29,2 mg
Sodyum piruvat	11 mg
MEM non-esansiyel amino asit	1 mL

Tablo 3-7. %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonunun hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
NaCl	4 g
KCl	200 mg
EDTA 2 Sodyum Hidrat	100 mg
Tripsin 1:250	1250 mg
KH_2PO4	30 mg
NaH_2PO4	23,84 mg
$NaHCO_3$	175 mg
D-glikoz	500 mg
Fenol Kırmızısı	5,31 mg
Distile Su	500 mL

Tablo 3-8. Stok hücre dondurma medyumunun hazırlanması

KİMYASAL ADI	MİKTAR
HKM STOK	99 mL
L-glutamin	29,2 mg
Sodyum piruvat	11 mg
MEM non-esansiyel amino asit	1 mL

Tablo 3-9. %40 FCS ilaveli hücre dondurma medyumunun hazırlanması

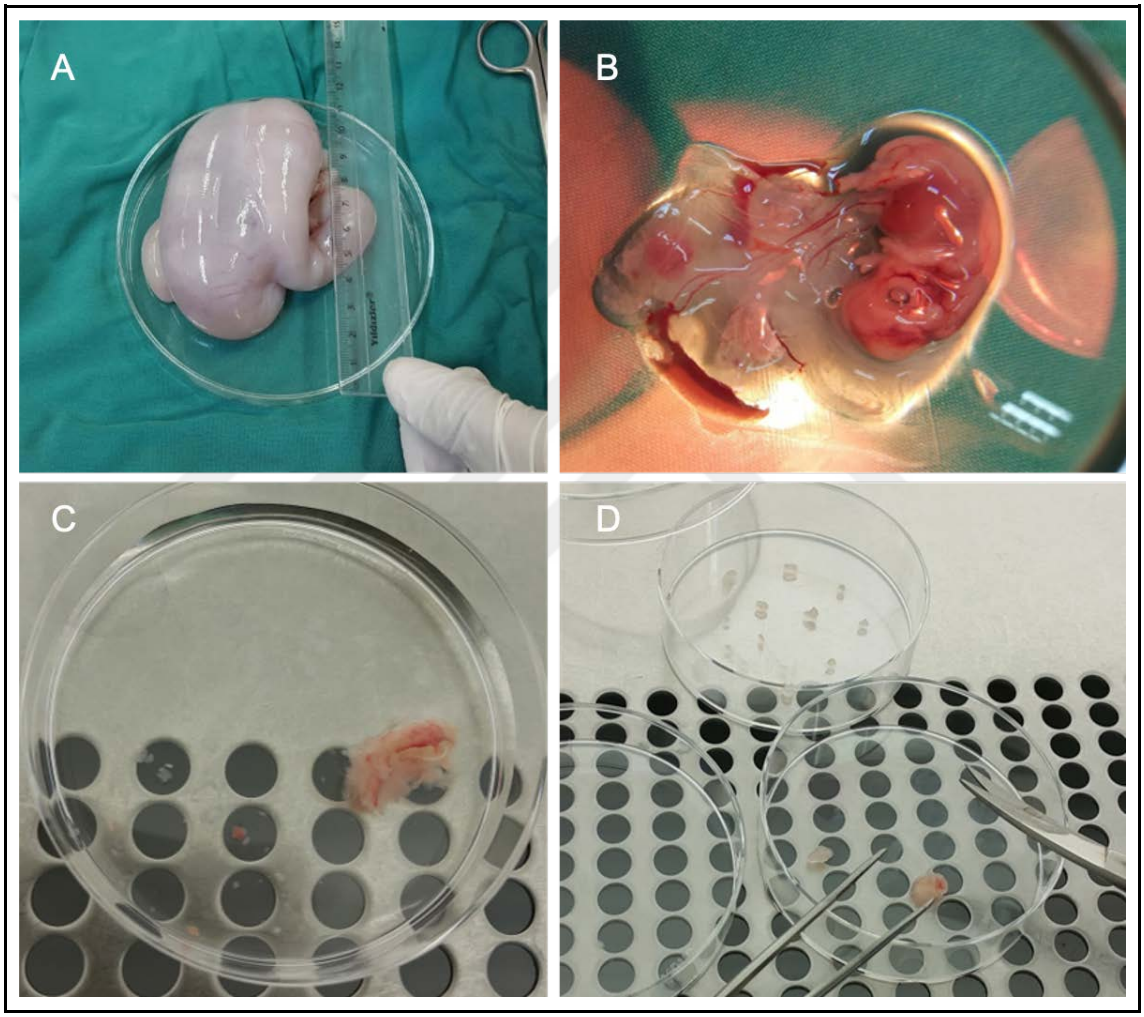
KİMYASAL ADI	MİKTAR
Stok Hücre Dondurma Medyumu	60 mL
FCS % 40	40 mL

Tablo 3-10. %20 DMSO ilaveli hücre dondurma medyumunun hazırlanması.

KİMYASAL ADI	MİKTAR
Stok Hücre Dondurma Medyumu	80 mL
DMSO % 20	20 mL

3.2.2. Primer Koyun Embriyonik Fibroblast (PKEF) Hücre Hattının Elde Edilmesi

Mezbahada gebeliğin yaklaşık 45-60. gününde kesilmiş koyunlardan elde edilen uterus öncelikle akan suyun altında yıkandı. İçerisinde %10 oranında antibiyotik içeren 30-32°C Dulbecco'nun fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) bulunan termos ile laboratuvara getirildi (Şekil 3-1). Fetüs uterus içerisinden steril koşullarda çıkarıldıktan sonra PBS ile dikkatlice yıkandı.



Şekil 3-1. Mezbahadan getirilen fetüsten primer hücre kültür hazırlanması.

A: Mezbahadan getirilen 40-45 günlük gebe uterus

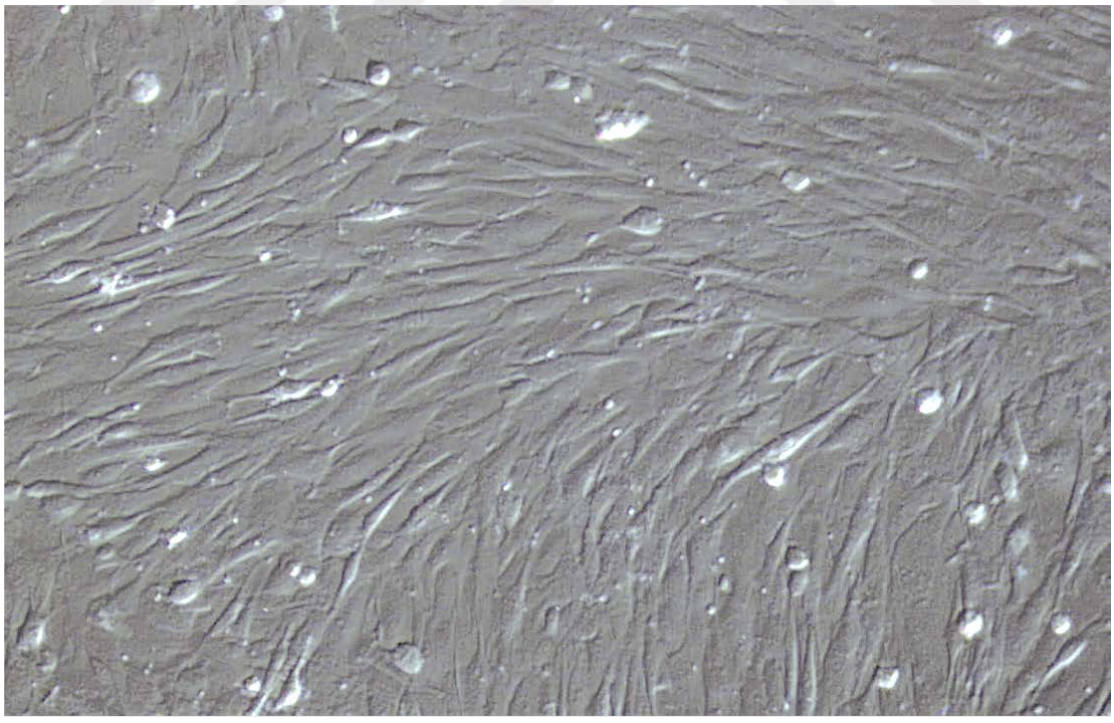
B: 40-45 günlük fetüs

C: Fetüsün baş, ekstremite ve iç organları uzaklaştırıldıktan sonraki doku parçası

D: Doku parçalarının petri tabanına yerleştirilmesi

Baş, ekstremiteler ve iç organları uzaklaştırıldıktan sonra, geriye kalan fetüs gövdesi PBS ile yıkanarak steril bir 100x20 mm petriye alındı. Fetüs gövdesinden toplu iğne başı büyüklüğünde parçalar kesilerek 60 mm çaplı hücre kültür petrisinin tabanına

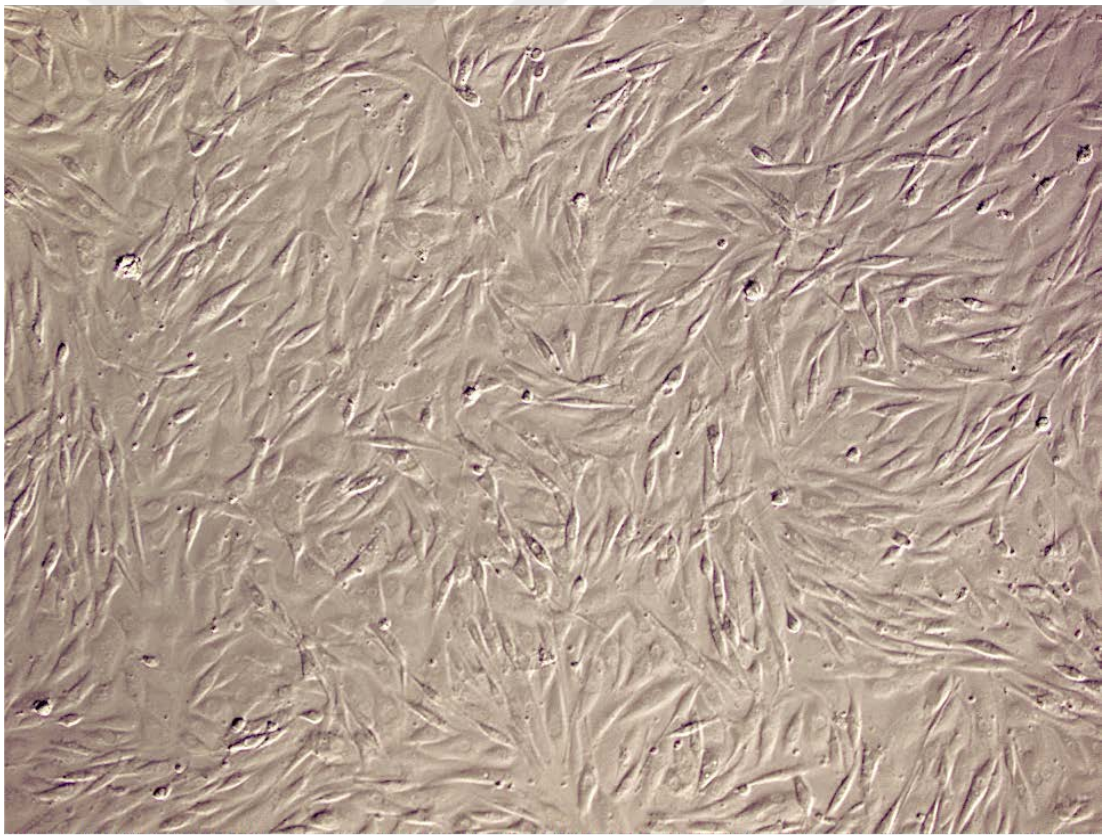
aralıklı olarak bırakıldı. Petrilere 5 mL %20 Fötal Sığır Serumu (FCS) ve %1 oranında antibiyotik (penisilin-streptomisin kombinasyonu) içeren hücre kültür medyumu ilave edildi. Petriler 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 7-11 gün süre ile kültüre edildi ve gelişimleri takip edildi. Hücreler üredikten ve birbirlerine destek olabilecek yoğunluğa ulaştıktan sonra doku parçaları ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yayılması petri tabanında %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra (Şekil 3-2), %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipetin mekanik etkisi ile de yıkanarak hücreler tüpe alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve Thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. Sonrasında hücreler 100.000 hücre/cm2 konsantrasyonda olacak şekilde yeni petri kaplarına ekildi (Pasaj 1; P1). P2 aşamasına kadar pasajlanarak çoğaltılan sağlıklı fibroblast hücreleri dondurularak -196°C'de kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde saklandı.



Şekil 3-2. Primer koyun embriyonik fibroblast hücre hattı

3.2.3. Primer Koyun Erişkin Fibroblast (PKF) Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

Mezbahada kesilmiş erişkin bir koyunun kulağından steril koşullarda alınan doku parçası, öncelikle akan suyun altında dezenfektanlı cerrahi el ve tırnak fırçası ile yıkandı. Sonrasında içerisinde 30-32°C'de %10 oranında antibiyotik içeren PBS bulunan 50 mL steril tüplere koyularak laboratuvara taşındı. Laboratuvar ortamına getirildikten sonra, doku parçası tekrar dezenfektanlı fırça ile yıkanarak üzerinde bulunan kıllar tıraş edilerek uzaklaştırıldı. Doku parçasının etrafından steril bir makas yardımıyla 0,5 cm genişliğinde parçalar kesilerek en dış kısımlar uzaklaştırıldı. Kalan doku parçası PBS ile yıkandı ve steril bir 100x20 mm petriye alındı. Uygun dezenfeksiyon işlemleri tamamlanmış olan doku parçası, steril hücre kültür seti kullanılarak kıkırdak ve deri bölümleri birbirinden dikkatlice ayrıldı.



Şekil 3-3. Primer koyun fibroblast hücre hattı

Derinin epidermis tabakasının altından toplu iğne başı büyüklüğünde parçalar kesilerek 60 mm çaplı hücre kültür petrisinin tabanına aralıklı olarak bırakıldı. Petrilere 5 mL %20 Fötal Sığır Serumu (FCS) ve %1 oranında antibiyotik (penisilin 90 IU/mL ve

streptomisin 100 µg/mL) içeren hücre kültür medyumu ilave edildi. Petriler 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 7-11 gün süre ile kültüre edilip ve gelişimleri takip edildi. Hücrelerin ürediği ve birbirlerine destek olabilecek yoğunluğa ulaştığı belirlendikten sonra doku parçaları ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin bölünmesi petri tabanında %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra (Şekil 3-3), %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipet ile al ver yapılıp mekanik etki ile petri yüzeyi yıkanarak hücreler tüpe alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve Thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. Sonrasında hücreler 100.000 hücre/cm^2 konsantrasyonda olacak şekilde yeni petri kaplarına ekildi (Pasaj 1; P1). P2 aşamasına kadar pasajlanarak çoğaltılan sağlıklı fibroblast hücreleri dondurularak -196°C'de kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde saklandı.

3.2.4. Erişkin ve Embriyonik Fibroblast Hatlarının Dondurulması

P2 aşamasına kadar pasajlanarak çoğaltılan sağlıklı fibroblast hücreleri, petri tabanında %80-90 yoğunluğa ulaştıktan sonra %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipet ile al ver yapılıp mekanik etkisi ile petri yüzeyi yıkanarak süspansiyon haline getirilen hücreler tüpe alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. Final hücre konsantrasyonu oranı 1 milyon hücre/mL olacak şekilde final hücre dondurma medyumu hacmi hesaplandı. Finalde hücre dondurma medyumunda %20 FCS ve %10 dimetilsulfoksit (DMSO) olacak şekilde, hesaplanan dondurma medyumu ikiye bölündü. İlk hücre dondurma medyumu içerisinde %40 FCS olacak şekilde hazırlandı ve oda sıcaklığında hücre pelletine eklenerek süspanse hale getirildi. Sonrasında içerisinde hücre süspansiyonu bulunan tüp buz akülerinin üzerine yerleştirildi ve %20 DMSO içeren ikinci hücre dondurma medyumu hücrelerin üzerine yavaş ve kademeli olarak ilave

edildi. Sonrasında 2 milyon hücre/vial'de olacak şekilde kriyovialler içerisinde dondurma konteynerine (Mr.Frosty) yerleştirildi. Dondurma konteynerinde -80°C'de 24 saat bekletildikten sonra kriyovialler taşıma çubuklarına yerleştirilerek -196°C'de kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde saklandı.

3.3. Gen taşıyıcı Nanopartiküllerin Sentezi ve Transgenezis için Gen Yüklemesi

Çalışmada kullanılacak olan mChi ve PBAE polimerlerinin sentez ve optimizasyon süreçleri ile ilgili olarak hem Türk Patent Enstitüsü ve hem de Avrupa Patent Ofisine başvuruları yapılmıştır. MChi polimerinin başvurusu sonuçlanmış olup, PBAE polimerinin inceleme süreci devam etmektedir.

3.3.1. Modifiye Kitosan Sentezi

Çalışma grubumuz tarafından geliştirilen modifiye mChi esaslı nanopartiküller patent [TPE (09.09.2014-2014/10605); EPO (09.09.2014–EP14184168.4)] metinlerinde belirtildiği şekilde sentezlendi ve saflaştırıldı.

3.3.2. PBAE Sentezi

Çalışma grubumuz tarafından geliştirilen modifiye PBAE esaslı nanopartiküller patent başvuru [TPE (09.09.2014-2014/10603); EPO (09.09.2014– EP14184166.8)] metinlerinde belirtildiği şekilde sentezlendi ve saflaştırıldı.

3.3.3. nLDH Bileşiklerinin Sentezi

İstenilen kimyasal bileşimdeki nLDH'ların sentezi; bileşimine girecek olan 2^+ değerlikli metal katyonunun (M^{2+}) klorür tuzu ($Zn/MgCl_2$) ile 3^+ değerlikli metal katyonunun (M^{3+}) klorür tuzunun ($AlCl_3$) alkali çözeltide birlikte çöktürülmesi yöntemine göre aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Üç mmol $M^{2+}Cl_2$ ve 1 mmol $AlCl_3.6H_2O$ 10 mL deiyonize su içerisinde çözülüp bu çözelti karıştırılmakta olan 6 mmol NaOH içeren 40 mL sulu çözeltiye hızlı bir şekilde damla damla ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında azot gazı akımı altında 10 dakika boyunca karıştırılıp elde edilen çözelti 5 dakika 4500 g'de santrifüje edildi. Pelletler 40 mL deiyonize suda 2 defa yıkandıktan sonra 10 dakika 4500 g'de santrifüj edilerek oluşan

pelletler 50 mL deiyonize su içerisinde dağıtıldı. Takiben elde edilen heterojen süspansiyon otoklav (yüksek sıcaklık ve basınç reaktörü) içerisinde farklı sıcaklık (50 ve 100°C) ve farklı sürelerde (2, 4, 8, 16, 24 ve 48 saat) bekletildi. Ele geçen homojen süspansiyondaki nanopartiküllerin miktar, boyut ve PDI analizleri yapıldı.

3.3.4. Gen üretimi, Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Optimizasyonu

3.3.4.1. Gen Üretimi

Gen üretimi Ausubel ve ark. (2003)'nın belirtmiş olduğu protokollere göre gerçekleştirilmiştir. Kullanılan medyum ve yöntemler sırasıyla aşağıda verilmiştir.

3.3.4.1.1. Kullanılan Medyumlar

Tablo 3-11. $CaCl_2$ solüsyonu hazırlanması

KİMYASALLAR	KONSANTRASYON	MİKTAR
$CaCl_2.2H_2O$	60 mM	0.442 g
Gliserol	% 15	7,5 mL
dH_2O		50 mL'ye tamamla

Tablo 3-12. Luria-Bertani (LB) medyumunun hazırlanması

KİMYASALLAR	MİKTAR
Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
dH_2O	1 L
121 °C'de 8 dk otoklav	

Tablo 3-13. LB agar besi yerinin hazırlanması

KİMYASALLAR	MİKTAR
Tripton	10 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
dH_2O	1 L
121 °C'de 8 dk otoklav	

Tablo 3-14. Süper Optimal Medyumun (SOM) hazırlanması

KİMYASALLAR	MİKTAR
Tripton	2 g
Maya ekstraktı	5 g
NaCl	0,058 g
KCl	0,0186 g
$MgCl_2$	0,095 g
$MgSO_4$	0,23 g
Glikoz	0,36 g
dH_2O	100 mL
121 °C'de 8 dk otoklav	

Tablo 3-15. TAE Buffer 50X hazırlanması

KİMYASALLAR	KONSANTRASYON	MİKTAR
Tris Baz	2 M	242 g
Glasiyal Asetik Asit		57,1 mL
EDTA	50 mM	14,6 g
dH_2O		1 L

Tablo 3-16. TAE Buffer 1X hazırlanması

KİMYASALLAR	MİKTAR
TAE Buffer 50X	100 mL
dH_2O	900 mL

Tablo 3-17. %1,5 agaroz jelin hazırlanması

KİMYASALLAR	MİKTAR
Agaroz	3 g
TAE Buffer 1X	200 mL

3.3.4.1.2. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Gen üretiminde kullanılacak olan bakteri hücrelerinin transformasyon etkinliği kazanabilmesi için $CaCl_2$ metodu kullanıldı. Bakteri hücrelerinin Ca iyonu ile muamele edilmesi, hücrelerin plazmid DNA'yı almasını yani kompetent olmalarını sağlamaktadır. Ca uyarımı devamında yapılan ısı şoku plazmid DNA'nın bakteri hücrelerine girmesini sağlar (Ausubel ve ark., 2003). *Escherichia coli* hücrelerine belirtilen yöntemle gen

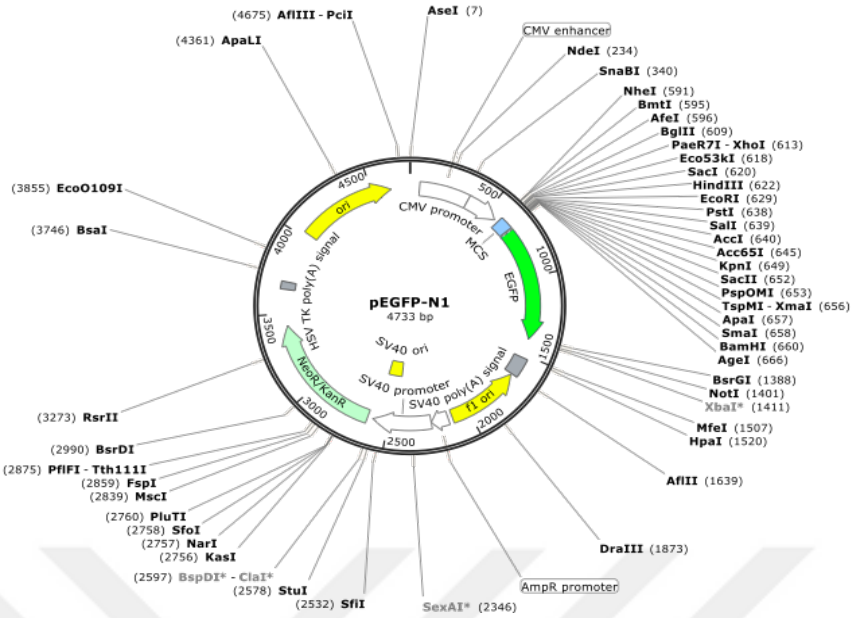
aktarımı gerçekleştirildikten sonra aktarılan plazmid DNA'nın antibiyotik direncini kodlayan gen parçasına uygun olarak, dirençli olduğu bilinen antibiyotiği içeren ortamda bakteri seleksiyonu gerçekleştirilir. Böylece bünyesinde aktarılan plazmidi içeren kolonilerin üremesi sağlanır (Ausubel ve ark., 2003).

Çalışmada kullanılacak olan pEGFP-N1 plazmidini üretmek amacıyla kompetent hücre üretimi için *Escherichia coli* hücreleri, içerisinde 5 mL LB medyum bulunan santrifüj tüpü içerisine ekildi ve 37°C sallamalı etüvde 250 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 4 mL alınarak 400 mL LB medyum içerisine eklendi ve 37°C sallamalı etüvde, hücre yoğunluğu spektrofotometre ölçüm değeri OD_{600} 0,375 oluncaya kadar inkübe edildi. Bakteriler 50 mL steril santrifüj tüplerine transfer edildi ve 10 dk boyunca buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda, hücrelerin bulunduğu santrifüj tüpleri +4°C'de, 1600 g kuvvetle 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, bakteri pelletleri 10 mL soğutulmuş $CaCl_2$ ile sulandırıldı ve 4°C'de, 1100 g kuvvetle 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında tekrar 10 mL $CaCl_2$ ile resüspanse edilen bakteri pelletleri buz üzerinde 30 dk bekletildi ve 4°C'de, 1100 g kuvvetle 5 dk süre ile tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelletler 2 mL $CaCl_2$ ile sulandırıldı. Elde edilen kompetent hücreler, önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine 250 µL olacak şekilde porsiyonlandı ve -80 °C'de saklandı.

3.3.4.1.3. Kompetent Hücrelerin Transformasyonu

Kompetent hücrelerin, plazmid DNA ile transformasyonu için; -80°C'de saklanan kompetent hücreler buz üzerinde eritildi ve 100 µL kompetent hücre içerisine 10 ng pEGFP-N1 (Şekil 3-4) plazmid DNA eklenerek buz üzerinde 10 dk bekletildi.

Hücrelere ısı şoku oluşturmak için 42°C su banyosuna alınarak 2 dk bekletildi. Santrifüj tüplerine 1 mL LB medyum eklendi ve sallamalı etüvde 37°C ve 250 rpm'de 1 saat bekletildi. Daha sonra, plazmid içeren kompetent hücreler 200 mL LB medyumu içeren erlenlere ekildi. Karışıma final konsantrasyonu 45 mg/mL olacak şekilde kanamisin ilave edilerek 37°C'de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün LB medyumda üreyen bakteri hücreleri, 50 mL'lik santrifüj tüplerine bölündü ve 5000 g'de 5 dk santrifüje edildi. Süpernatantlar atıldıktan sonra pellet halinde kalan bakterileryaklaşık 2500 µL'lik porsiyonlar halinde -20°C'de dondurularak saklandı.

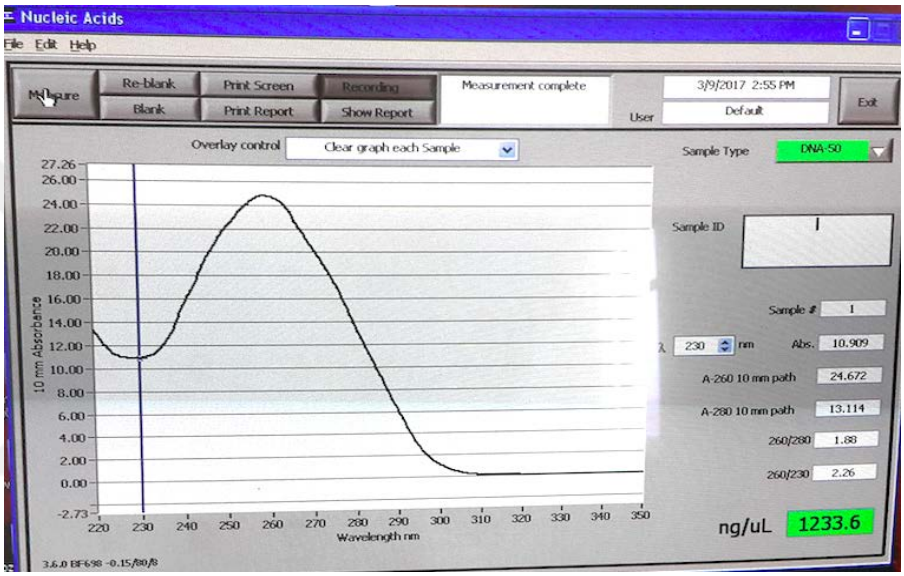


Şekil 3-4. Çalışmada kullanılan yeşil floresan işaret geni (eGFP) içeren plazmidin haritası (pEGFP-N1)

3.3.4.1.4. pEGFP-N1 Plazmid Eldesi

Plazmid eldesi' Qiagen® Plazmid Midi Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Plazmid eldesi için gerekli olan tüm kimyasal ve solüsyonlar izolasyon kitiyle birlikte temin edildi. Solüsyon 1 ve 3 çalışmaya başlamadan önce 4°C'de bekletildi. Çalışmada kullanılacak olan Solüsyon 1 miktarı belirlendi ve içerisine RNase A ve LyseBlue® önerilen oranlarda eklendi. Bakteri pelletleri oda sıcaklığına çıkarıldı ve eridikten sonra, üzerine 4 mL Solüsyon 1 eklendi ve pipetleme yardımıyla homojen bir süspansiyon haline getirildi. Daha sonra 4 mL Solüsyon 2 eklendi ve hızlıca karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk bekletildi. LyseBlue® kullanımında solüsyonun mavi renk gösterdiği görüldü. Süre bitiminde 4 mL soğutulmuş Solüsyon 3 eklendi ve yine hızlıca karıştırıldı. Karışım 15 dk buz üzerinde bekletildi ve renksiz bir hal alana kadar karıştırıldı. Daha sonra süspansiyon santrifüj tüplerine alındı, 4°C'de 30 dk süreyle 20.000 g kuvvetinde santrifüje edildi. Süpernatant, kit içerisinde bulunan filtre 4 mL Solüsyon QBT ile yıkandıktan sonra filtreden geçirildi. Filtrasyondan sonra, filtre iki kez 10 mL Solüsyon QC ile tekrar yıkama yapıldı. Yıkama bittikten sonra 5 mL önceden 65°C'de ısıtılmış Solüsyon QF filtreden geçirilerek plazmid DNA'nın solüsyon içerisinde çözünmesi sağlandı. Daha sonra 3,5 mL oda sıcaklığındaki izopropanol plazmid DNA'nın çöktürülmesi için eklendi ve 15.000 g'de 30 dk 4°C'de santrifüje edildi. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatlice

uzaklaştırıldı ve plazmid DNA pelleti 2 mL oda sıcaklığında %70'lik etanol ile sulandırılarak tekrar 15.000 g 10 dk santrifüje edildi. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve 5-10 dk bekletilerek tüpün dibinde kalan etanolün buharlaşarak tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Sonunda plazmid DNA 100 µL Solüsyon TE içerisinde çözündürüldü. Elde edilen plazmid DNA'nın konsantrasyon ve DNA saflık değeri, Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 spektrofotometre ile ölçülerek belirlendi (Şekil 3-5) ve -20°C'de stok halde saklandı.



Şekil 3-5. Elde edilen plazmidlerin spektrofotometre ile ölçüm sonuçlarına bir örnek

3.3.4.2. Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Jel Elektroforez Kontrolleri

Agaroz jel elektroforez yöntemi, nanopartiküllerin plazmid DNA yükleme kapasitesini ölçmek için kullanıldı.

Öncelikle %1,5'luk agaroz jel, 3 g agarozun 200 mL 1X TAE Buffer içerisinde mikrodalga fırında ısıtılmasıyla hazırlandı. Aynı 1X TAE Buffer ile elektroforez tankı doldurudu. Agaroz jel berrak bir hale geldikten sonra biraz soğuması beklendi. İçerisine 20 µL SYBR® Safe DNA jel boyası eklendi. Elektroforez tankına uygun jel dökme platformu taraklar koyularak hazırlandı ve jel buraya dökülerek donana kadar beklendi. Jel kalınlığının 0,5-1 cm kalınlığında olmasına dikkat edildi. Jel donduktan sonra, taraklar kuyucuklara zarar vermeden dikkatlice ayrıldı ve platform üzerinde jelle birlikte hava kalmayacak şekilde tanka yerleştirildi.

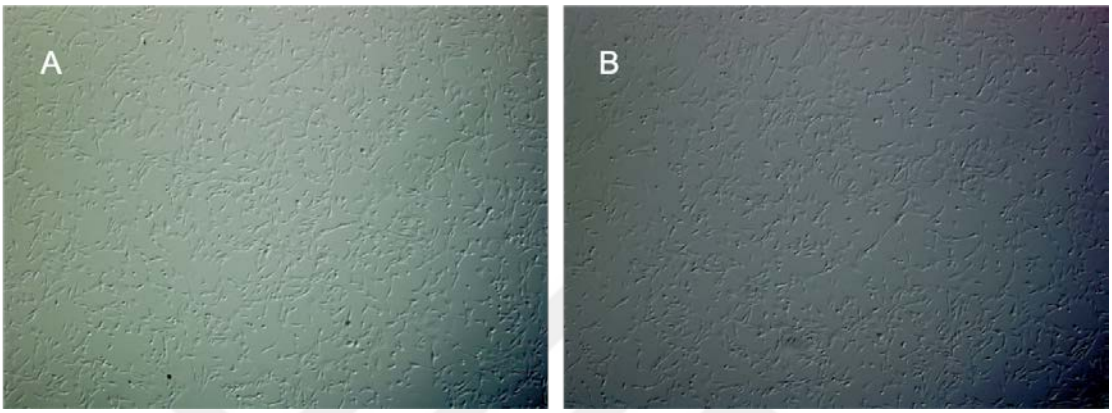
Çalışmada kullanılacak olan nmChi, LDH nanopartikülleri ve PBAE polimeri, pEGFP-N1 plazmidi ile gen miktarı sabit kalacak şekilde polimer ağırlığı/gen ağırlığı oranı (µg/µg) 1:1, 2:1, 3:1,..., 15:1, 20:1 şeklinde belirlendi. Belirlenen oranlar 0,5 mL mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı ve 30 dk inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, tüplerde toplamda 9 µL karışım olacak şekilde distile su ile tamamlandı ve 1 µL 10X yükleme boyası eklendi. Daha sonra elde edilen 10 µL polimer-gen karışımı, elektroforez tankına koyulan jeldeki kuyucuklara sırasıyla otomatik pipet yardımıyla yüklendi. Elektroforez voltaj ayarları 100V 80A'a ayarlandıktan sonra 1 saat yürütüldü. Süre sonunda yükleme boyasının kuyucuklardan yeterince uzaklaştığı görüldükten sonra, jel dikkatlice tanktan alındı. Agaroz jele eklenen SYBR boyası sayesinde, jel UV ışık altında incelenerek serbest plazmid DNA'nın kalmadığı nanopartikül-gen karışım oranı belirlendi. Bu oran maksimum gen taşıma kapasitesi olarak kaydedildi. Daha sonra belirlenen bu oran ve üzerindeki değerler, zeta potansiyeli ölçümleri yapıldı ve zeta potansiyeli +20 mV'un üzerinde olan nanopartikül oranları belirlendi.

3.4. Hücre Hatlarında Gen Transferi

3.4.1. PKF ve PKEF Hücre Hatlarının Transfeksiyon Öncesinde Hazırlanması

Gen transfeksiyonu öncesinde, P2'de dondurularak saklanan hücre hatları 37°C sıcak suda benmari yöntemi ile eritildikten sonra, hücre kültür medyumu 1:1 oranında eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine %10 FCS içeren hücre kültür medyumu ilave edildi ve hücrelerin T25 flasklara ekimi yapıldı (P3). Ekimden 2 gün sonra hücreler invert mikroskopta üreme potansiyeli ve sağlıklı görünüm açısından değerlendirildikten sonra, petrilerde bulunan medyum uzaklaştırıldı. Petriler PBS ile yıkandıktan sonra, %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipetin mekanik etkisi ile yıkanarak kaldırılan hücreler 15 mL santrifüj tüpüne alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %10 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve Thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi.

Transfeksiyon işleminden 18 saat önce olacak şekilde hücreler 24 kuyucuklu petrilere, kuyucuk başına 20.000 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı (P4) ve üzerlerine 500 µL hücre kültür medyumu ilave edildi. Uygulama öncesinde hücrelerin invert mikroskopta sağlıklı görünüm ve %60-70 oranında yayılım göstermesi yönünden kontrolleri yapıldı (Şekil 3-6).



Şekil 3-6. PKF (A) ve PKEF (B) hücre hatlarının %60-70 oranında yayılım göstermesi örnek görüntüsü

3.4.2. Nanopartikül-Plazmid Komplekslerinin Hazırlanması

3.4.2.1. nmChi-plazmid Kompleksinin Hazırlanması

Buzdolabında kullanıma hazır bekletilen mChi oda sıcaklığına çıkarıldı. Optimizasyonlarda belirlenen konsantrasyonlarda 0,5 mL ependorfların içerisine eklendi ve üzerlerine 1 µg plazmid ilave edilerek nanopartikül ve plazmidin karışması sağlandı. Oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak 30 dakika bekletildi.

3.4.2.2. LDH-plazmid Kompleksinin Hazırlanması

Buzdolabında kullanıma hazır bekletilen LDH süspansiyonu oda sıcaklığına çıkarıldı. Optimizasyonlarda belirlenen konsantrasyonlarda 0,5 mL ependorfların içerisine eklendi ve üzerlerine 1 µg plazmid ilave edilerek nanopartikül ve plazmidin karışması sağlandı. Oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak 30 dakika bekletildi.

3.4.2.3. PBAE-plazmid Kompleksinin Hazırlanması

Buzdolabında katı formda bekletilen PBAE, bir cam beherin içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde DMSO içerisinde çözündürüldü. Optimizasyonlarda

belirlenen konsantrasyonlarda 0,5 mL ependorfların içerisine eklendi ve üzerlerine 1 µg plazmid ilave edilerek polimer ve plazmidin karışması sağlandı. Oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda nanopartikül oluşumu için başka bir ependorftaki 50 µL transfeksiyon medyumu olarak seçilen Optimem® medyumu üzerine karışım damla damla eklenerek, 30 sn vorteks yapıldı.

3.4.2.4. Lipofectamine® -plazmid Kompleksinin Hazırlanması

Pozitif kontrol olarak ticari bir transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine® kullanıldı. Optimizasyonlarda belirlenen konsantrasyonlarda 0,5 mL eppendorf tüplerinin içerisine eklendi ve üzerlerine 1 µg plazmid ilave edilerek polimer ve plazmidin karışması sağlandı. Oda sıcaklığında ara ara karıştırılarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda karışımın üzerine 50 µL Optimem® transfeksiyon medyumu eklendi ve 10 saniye vorteks yapıldı.

3.4.3. PKF ve PKEF Hücrelerinin Nanopartikül-Plazmid Kompleksleri ile Transfeksiyonu

Hücrelerin bulunduğu petrilerdeki hücre kültür medyumu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar 250 µL PBS ile yıkandı. Hazırlanan nanopartikül-plazmid kompleksleri, hücrelerin üzerine damla damla eklendi ve kuyucukta toplamda 300 µL medyum olacak şekilde üzerlerine FCS ve antibiyotik içermeyen Optimem® medyumu ilave edildi. Petriler 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 4 saat süreyle bekletildi. Süre sonunda transfeksiyon medyumu uzaklaştırıldı ve kuyucuklara %20 FCS içeren hücre kültür medyumu eklendi. Petriler 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 72 saat süre ile inkübe edildi.

3.4.4. Transfekte Hücre Gruplarının Seleksiyonu

Transfekte edilen hücrelerin saflaştırılması amacıyla plazmidde bulunan Kanamisin/Neomisin direnç geninin çalışabileceği ticari bir seleksiyon ürünü olan G418 solüsyonu kullanıldı. Yapılan denemelerde, 400, 600, 800, 1000 µg/mL (Shin ve ark., 2006; Liu ve ark., 2018a) konsantrasyondaki G418 gen transferi yapılmamış PKF ve PKEF hücreleri üzerinde denendi. Yapılan denemeler sonucunda 800 µg/mL dozun 3-5 gün içinde hücreleri öldürmeye başladığı belirlendiğinden transfekte hücrelerin

seleksiyonu için seçildi. Transfeksiyonun 72. saati sonrasında, hücrelerin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı. Petriler PBS ile yıkandıktan sonra, %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipet ile al ver yapılarak mekanik etki ile kaldırıldı ve hücreler 15 mL santrifüj tüpüne alındı. Tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %10 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve Thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. İçerisinde %20 FCS bulunan hücre kültür medyumu ile G418 solüsyonu 800 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı ve 100.000 hücre/cm^2 olacak şekilde hücreler bu medyum ile 100 mm petrilere ekildi. Hücreler gün aşırı kontrol edilerek 3 günde bir medyumları yenilendi ve ölü hücreler uzaklaştırıldı. Seleksiyon medyumunda 8. gününü tamamlayan hücreler petrilerden kaldırılarak hücre akış ölçerde transfekte hücre oranları kontrolleri yapıldı.

3.4.5. Seleksiyonu Yapılan Transfekte Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Transfekte hücre gruplarının seleksiyonları yapıldıktan sonra, hücreler Nano-DigitCool™ cihazı kullanılarak kontrollü yavaş dondurma yöntemiyle payetlerde donduruldu. Bu amaçla, petrilerdeki transfekte hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipet ile al ver yapılarak hücreler süspansiyon haline getirilip tüpe alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve Thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. Final hücre konsantrasyonu payette 100.000 hücre olacak şekilde final hücre dondurma medyumu hacmi hesaplandı. Finalde hücre dondurma medyumunda %20 FCS ve %10 DMSO olacak şekilde, hesaplanan dondurma medyumu ikiye bölündü. İlk olarak DMSO içermeyen medyum içerisinde %40 FCS olacak şekilde birinci dondurma medyumu hazırlandı ve oda sıcaklığında hücre peletine eklenerek süspanse hale getirildi. Sonrasında içerisinde hücre süspansiyonu bulunan tüp buz akülerinin üzerine yerleştirildi ve %20 DMSO içeren ikinci hücre dondurma medyumu hücrelerin üzerine yavaş ve kademeli olarak ilave edildi. Hücreler 100.000 hücre/payette olacak şekilde payetlere

çekildi. Payetlerin uçları polivinil alkol (PVA) ile kapatıldıktan sonra, +4°C'de hazır bekleyen dondurma cihazına (Nano-DigitCool™, IMV Technologies) yerleştirildi. Dondurma cihazında program şu şekilde ayarlandı; +4°C'den -10°C'ye 1°C/dk hızla soğutulduktan sonra, -10°C'de 10 dk bekleme, sıvı azota batırılmış pamuk yardımıyla seeding, 2 dk bekleme ve kontrol edildikten sonra -10°C'den -80°C'ye 8°C/dk'da hızla soğutma yapıldı. Sonrasında dondurma cihazından pens yardımıyla alınan payetler hızlıca sıvı azota daldırıldı ve çalışmanın bir sonraki aşamasında kullanılıncaya kadar -196°C'de sıvı azot içerisinde konteynırlarda saklandı.

3.5. Transfekte Somatik Hücre Gruplarının Yeniden Programlanması

Transfekte edilmiş olan hücrelerin hücre sikluslarının yeniden programlanması için kullanılan gruplar aşağıdaki gibidir:

1. Kontakt inhibisyon,
2. Serum açlığına bırakma,
3. Roscovitine uygulaması,
4. Trichostatin A uygulaması.

Dondurularak payetlerde saklanmış olan transfekte fibroblast grupları 37°C sıcak suda benmari yöntemi ile eritildikten sonra, hücre kültür medyumu 1:1 oranında eklenerek 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler %20 FCS içeren hücre kültür medyumu ile 100.000 hücre/cm^2 olacak şekilde petrilere ekildi. Petriler 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO_2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde %90 yayılım gösterene kadar beklendi. İstenilen yayılımı gösteren hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 2 dk 37,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda petri tabanından otomatik pipet ile al ver yapılarak hücreler süspanse edilip tüpe alındı ve tripsinizasyon etkisinin kaldırılması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peletinin üzerine 1 mL hücre kültür medyumu ilave edildi ve thoma lamı ile hücre konsantrasyonu belirlendi. Hücreler kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu petrilere ekildi.

3.5.1. Yeniden Programlama İçin Kullanılacak Solüsyonlar

Tablo 3-18. Serum açlığı için kullanılacak %0,5 FCS ilaveli HKM

KİMYASAL ADI	MİKTAR
HKM STOK	98,5 mL
FCS	0,5 mL
L-glutamin	29,2 mg
Sodyum piruvat	11 mg
MEM non-esansiyel amino asit	1 mL

Tablo 3-19. Roscovitine stok

KİMYASAL ADI	MİKTAR
Roscovitine	1 mg
DMSO	1 mL

Tablo 3-20. Trichostatin A stok

KİMYASAL ADI	MİKTAR
Trichostatin A (5 mM DMSO'da)	200 µL
DMSO	800 µL

3.5.2. Kontakt İnhibisyon

Petrilerdeki hücreler %70-80 oranında yayılım gösterdikten sonra, %10 FCS içeren hücre kültür medyumunda 5 gün süre ile 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde kültüre edildi. Süre sonunda hücrelerin %100'e yakın oranlarda yüzeyi kaplayarak birbirleri ile sıkı temasları kontrol edildi. Süre sonunda hücrelerde; hücre siklusu, apoptoz ve DNA metilasyon analizleri hücre akış sitometrisinde yapılarak değerlendirildi.

3.5.3. Serum Açlığına Bırakma

Petrilerdeki hücreler %70-80 oranında yayılım gösterdikten sonra, %10 FCS içeren hücre kültür medyumu ortamdan uzaklaştırıldı ve %0,5 FCS içeren hücre kültür medyumu eklendi. Hücreler 5 gün süre ile 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde serum açlığına bırakıldı. Süre sonunda hücrelerde; hücre siklusu, apoptoz ve DNA metilasyon analizleri, hücre akış sitometrisinde yapılarak değerlendirildi.

3.5.4. Roscovitine Uygulaması

Transfekte hücrelerde kullanlacak olan ideal dozun belirlenmesi için doz optimizasyon çalışmaları yapıldı. Yapılan denemelerde Roscovitine'in 10, 15, 20 ve 30 µM konsantrasyonları transfekte olmayan normal PKF ve PKEF hücre kültürlerinde 24 saat süre ile uygulandı.

Transfekte olmayan hücrelerle yapılan optimizasyon sonuçlarına göre transfekte hücre hatlarından senkronizasyon çalışması için 15 µM Roscovitine'in kullanılmasına karar verildi. Transfekte hücrelerin ekimi gerçekleştikten ve %70-80 oranında yayılım gösterdikten sonra, 15 µM Roscovitine ilaveli %10 FCS içeren hücre kültür medyumu medyum eklendi, 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 24 saat bekletildi. Süre sonunda hücrelerde; hücre siklusu, apoptoz ve DNA metilasyon analizleri, hücre akış sitometrisinde yapılarak değerlendirildi.

3.5.5. Trichostatin A Uygulaması

Transfekte hücrelerde kullanlacak olan ideal dozun belirlenmesi için doz optimizasyon çalışmaları yapıldı. Yapılan denemelerde Trichostatin A nın 25, 50, 75 ve 100 nM konsantrasyonları transfekte olmayan normal PKF ve PKEF hücre kültürlerinde 24 saat süre ile uygulandı.

Transfekte olmayan hücrelerle yapılan optimizasyon sonuçlarına göre transfekte hücre hatlarından senkronizasyon çalışması için 50 nM Trichostatin A kullanılmasına karar verildi. Transfekte hücrelerin ekimi gerçekleştikten ve %70-80 oranında yayılım gösterdikten sonra, 50 nM Trichostatin A ilaveli %10 FCS içeren hücre kültür medyumu eklendi, 37,5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 24 saat bekletildi. Süre sonunda hücrelerde; hücre siklusu, apoptoz ve DNA metilasyon analizleri, hücre akış sitometrisinde yapılarak değerlendirildi.

3.6. PKF ve PKEF Hücrelerinde Yapılan Analizler

Akış sitometrisi, hücre popülasyonlarında fazla sayıda hücrede bir veya birden fazla özelliğin değerlendirilmesine ve istatistik analizlerin yapılabilmesine imkan tanımaktadır. Bu anlamda, istenilen parametre verilerinin floresan mikroskop ile kıyaslandığında daha objektif ve istatistiksel olması bilimsel verilerin değerlendirilmesi

açısından önemlidir. Bu sebeplerden dolayı bilimsel çalışmalarda tercih edilen bir istatistiksel değerlendirme yöntemi olduğundan çalışmada hücrelerde yapılacak analizlerde akış sitometresi kullanılmıştır.

Hücreler, Guava® easyCyte 6-2L masaüstü hücre akış ölçer cihazında Incyte programı kullanılarak değerlendirildi. Analiz başına 5.000-10.000 hücre değerlendirildi. Elde edilen plot grafik üzerinde kullanılan floresan işaretçiye göre uygun ışıma gösteren ve göstermeyen hücre populasyonları belirlenerek değerlendirmeler gerçekleştirildi.

3.6.1. Transfeksiyon Etkinliği Analizleri

Transfeksiyon yapılmış olan hücreler, transfeksiyona bağlı oluşacak değişiklikleri belirlemek amacıyla transfeksiyondan 24. ve transfeksiyon oranlarının belirlenmesi için de 72. saatte akış sitometrisi kullanılarak değerlendirmeler yapıldı.

Öncelikle floresan ataçmanlı invert mikroskop ile natif muayenesi yapılan gruplar sağlıklı bir yayılım göstermesi ve 488 nm dalga boyundaki floresan ışık altında yeşil floresan ışıması kontrolleri yapıldı.

Natif kontroller sonrasında petrilerde bulunan medyum uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve yaklaşık 2 dk 38,5°C etüvde bekletildi. Süre sonunda otomatik pipet ile alver yapılarak petri tabanından hücreler kaldırıldı ve hücre süspansiyonları tüplere alındı. Tripsinizasyon etkisinin durdurulması için üzerine %20 FCS içeren hücre kültür medyumu 1:1 oranında ilave edildi. İçerisinde hücrelerin bulunduğu tüpler 1000 rpm 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 500.000/mL'de olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. Hücre akış ölçer cihazında analiz başına 5.000-10.000 hücre değerlendirildi. Elde edilen grafik üzerinde 480 nm de yeşil ışıma gösteren ve göstermeyen hücre populasyonları belirlendi.

3.6.2. Apoptoz Analizleri

Transfeksiyon yapılmış olan hücreler, transfeksiyondan sonra 24. saatte apoptoz analizleri yapılmak üzere petrilerden kaldırıldı. Apoptoz analizi için, FlowCellect Annexin Red kiti kullanıldı. Transfekte hücrelerin ürettiği GFP 488 nm de yeşil ışıma

gösterdiğinden çakışma göstermemesi için 562 nm de kırmızı ışıma gösteren konjugatlar seçildi.

Kitin içerisinde bulunan Annexin tampon çözeltisi 1x olarak hazırlandı, hücreler $1x10^6$/mL olacak şekilde sulandırıldı ve 100 µL hücre alınarak 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne eklendi. Üzerine 100 µL Annexin Red solüsyonu eklendikten sonra, 37,5°C ve %5 CO_2'li inkübatörde 15 dakika bekletildi. Sonrasında hücreler 300 g 5 dk oda sıcaklığında santrifüje edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 200 µL 1x Annexin tampon çözeltisi ile yeniden süspanse edildi ve 300 g 5 dk oda sıcaklığında tekrar santrifüje edildi. Hücreler tekrar 195 µL 1x Annexin tampon çözeltisi ile yeniden süspanse edildi ve 5 µL 7ADD eklendi. Hücreler 5 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra, hücre akış ölçerde mavi ve kırmızı lazerler ile değerlendirildi. Analiz başına 5.000-10.000 hücre değerlendirildi. Elde edilen grafik üzerinde sağlam, erken apoptotik, geç apoptotik ve ölü hücreler belirlendi.

3.6.3. Hücre Siklusu Analizleri

Yeniden programlama sonrası hücrelerde, hücre siklus analizleri Muse® Hücre Siklusu kiti kullanılarak yapıldı. Farklı gruplardaki hücreler yeniden programlama bitiminde petrilerden kaldırıldı. Hücreler $1x10^6$/mL olacak şekilde PBS ile sulandırıldı ve 300 g 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, hücreler yaklaşık 50 µL PBS içerisinde bırakıldı. Başka bir santrifüj tüpüne 1 mL -20°C %70'lik etanol eklendi. Santrifüj tüpü vorteks üzerindeyken, 50 µL hücre süspansiyonu damla damla etanolün içerisine eklendi. İşlem bitiminde santrifüj tüpleri -20°C'de 1 gece bekletildi.

Ertesi gün 200 µL (200.000 hücre) etanol ile fikse edilmiş olan hücrelerden alındı ve 300 g 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, 250 µL PBS ile süspanse edilen hücreler tekrar santrifüj edilerek yıkandı ve alkol uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası hücrelere 200 µL boya ilave edildi ve 30 dk oda sıcaklığında beklendi.

Elde edilen histogram grafikleri üzerinde G0/G1, S ve G2/M fazlarına göre popülasyonlar belirlendi (Cheong vd., 2003; Beaujean vd., 2004).

3.6.4. DNA Metilasyon Analizleri

Hücrelerde yeniden programlama öncesi ve sonrasında, DNA metilasyon analizleri anti-5-metil sitozin primer antikoru (anti-methylcytosine mouse monoclonal

antibody, clone 33D3) ve kırmızı floresan konjugatlı sekonder antikoru (Goat anti-mouse IgG antibody, rhodamine konjugat) kullanılarak yapılmıştır.

Hücreler, 1,5 mL mikrosantrifüj içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde eklendi ve PBS ile 1000 g 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, fiksasyon işlemi için %4 paraformaldehit çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Daha sonra hücreler permeabilizasyon işlemi için %0,75 Triton-x 100 ve %0,75 Tween 20 ilaveli 1 mL PBT (%0,1 Tween-20 ilaveli PBS) ile sulandırıldı ve oda sıcaklığında 1 saat beklendi. Süre sonunda tekrar santrifüj yapıldı ve kromatin denatürasyonu için 500 µL 4 N HCl eklenerek oda sıcaklığında 10-15 dk beklendi. Hücreler 1 mL PBT ile 30 dk yıkandı, %0,25 Tripsin-EDTA ile 1 dk 37 °C'de muamele edildi ve üzerine 1 mL %10 sheep serum içeren PBT eklendi. Santrifüj ile süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 mL %30 sheep serumlu PBT eklenerek 1 gece 4°C'de bekletildi.

Ertesi gün, hücreler santrifüj edildi ve süpernatantın tamamı atıldı. Hücrelerin üzerine 1:60 primer antikor (2 mg/mL BSA içeren PBT)) eklendi ve 1 gece 4°C'de bekletildi.

Ertesi gün hücreler 1 mL PBT ile santrifüj edildi ve 1:100 sekonder antikor eklenerek 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 1 mL PBT eklenip santrifüj uygulanarak yapılan yıkamadan sonra hücre akış ölçerde değerlendirildi.

Hücre akış ölçerde analiz sırasında kırmızı yansıma gösteren veriler, data plot ve histogram grafikleri üzerinde DNA metilasyon seviyesi farklılıklarına göre oluşan veriler kaydedildi (Çelik ve ark., 2014).

3.7. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmada elde edilen veriler, SPSS for Windows programının 13.0 versiyonu kullanılarak değerlendirildi.

Verilen normallik analizlerinin yapılması sonrasında, parametrik olmayan verilerin analizlerinde gruplar arasındaki farkların önemlilik analizi Kruskal Wallis testi ile yapıldı ve grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametrik verilerin analizlerinde ise Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve farklılıkların önemini belirlemek için Tukey testi uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Fibroblast Hücre Hatlarının Elde Edilmesi

4.1.1. PKEF Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurularak Saklanması

Mezbahada gebeliğin yaklaşık 45-60. gününde kesilmiş koyunlardan elde edilen fetüsten uygun koşullarda fibroblast primer kültürü yapılmış ve 7-10 gün süreyle gelişimleri takip edilmiştir. Hücrelerin bölünmesi petri tabanında %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra, hücreler tabandan kaldırılarak pasajlanmıştır. P2 aşamasına kadar pasajlanarak çoğaltılan sağlıklı embriyonik fibroblast hücreleri dondurularak kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde -196°C'de saklanmıştır.

Bu amaçla üretilen PKEF hücre hattında 20 adet kriyotüp dondurularak sıvı azotta saklanmıştır.

4.1.2. PKF Hatlarının Elde Edilmesi ve Dondurularak Saklanması

Mezbahada kesilmiş erişkin bir koyunun kulağından alınan doku parçasından uygun koşullarda fibroblast primer kültürü yapılmış ve 7-10 gün süreyle gelişimleri takip edilmiştir. Hücrelerin bölünmesi petri tabanında %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra, hücreler tabandan kaldırılarak pasajlanmıştır. P2 aşamasına kadar pasajlanarak çoğaltılan sağlıklı erişkin fibroblast hücreleri dondurularak kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde -196°C'de saklanmıştır.

Bu amaçla üretilen PKF hücre hattından 20 adet kriyotüp dondurularak sıvı azotta saklanmıştır.

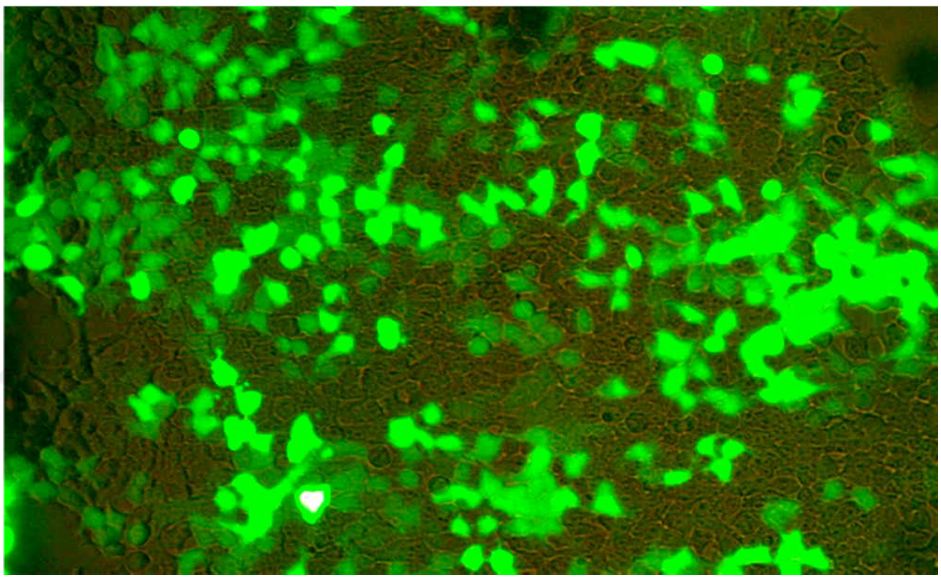
4.2. Gen Üretimi, Nanopartiküllere Gen Yüklenmesi ve Optimizasyonu

4.2.1. pEGFP-N1 Plazmid Eldesi ve Uygunluk Kontrolleri

Çalışmada kullanılan pEGFP-N1 plazmidinin laboratuvarımızda üretilen kompetent *Escherichia coli* bakteri hücreleri ile transformasyonu yapıldı. Transformasyon sonrasında plazmidler Qiagen® Plazmid Midi Kit kullanılarak izole edildi. Plazmidlerin saflık derecesi ve konsantrasyon tayinleri için, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'nda bulunan Ultraviolet-Görünür Spektrometre (UV-Vis Spectrometer) cihazında (NanoDrop™ Microvolume

Spectrophotometers and Fluorometer, ThermoFisher Scientific) ölçümleri yapıldı. Spektrofotometre ile yapılan ölçümler sonucunda saflık derecesi 260-270 aralığında ve konsantrasyonu yaklaşık 1000 ng/µL olan plazmidler 100 µL porsiyonlar halinde hazırlanıp kullanıma hazır şekilde -20ºC'de depolandı.

Üretilen plazmidlerin transfeksiyon etkinlik kontrolleri, standart hücre hattı olan İnsan Embriyonik Böbrek hücre hattında (Human Embryonic Kidney-HEK293) ve Lipofectamine® ticari ürünü ile test edildi (Şekil 4-1). Transfeksiyon sonrasında floresan mikroskopta %70 ve üzerinde yeşil ışıma görülen plazmidlerin çalışmada kullanılmasına karar verildi.



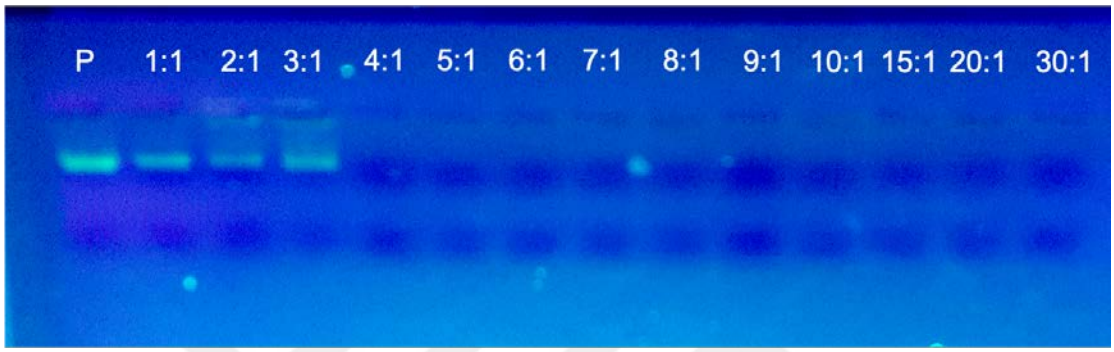
Şekil 4-1. Üretilen plazmidlerin HEK293 hücre hattında Lipofectamine® ile transfeksiyon sonucu görüntüsü

4.2.2. Gen Yüklenen Nanopartiküllerin Jel Elektroforez Sonuçları

Çalışmada kullanılan nmChi, LDH nanopartiküler sistemleri ve PBAE polimeri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı laboratuvarlarında sentezlendi ve gerekli analizleri yapıldı. Bu partiküllerin her biri için pEGFP-N1 plazmidi ile gen miktarı sabit kalacak şekilde nanopartikül ağırlığı/gen ağırlığı (µg/µg) oranı 1:1, 2:1, 3:1 gibi artan konsantrasyonlarda muamele edildi ve nanopartikül gen kompleksleri jel elektroforezde yürütüldü. Jel elektroforezde yürütülen komplekslerde serbest genin kalmadığı oran maksimum gen taşıma kapasitesi olarak belirlendi.

4.2.2.1. PBAE:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları

Sentezlenen PBAE nanopartikülü 1 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve gen (1 mg/mL) süspansiyonları µg/µg cinsinden 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 10:1, 15:1, 20:1 ve 30:1 oranlarında karıştırılarak jel elektroforezde 110 V 30 dk yürütüldü. Jel elektroforez sonuçlarına göre 4:1 oranındaki karışımda ortamdaki genin tamamının nanopartikül tarafından tutulduğu belirlendi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2. PBAE:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü

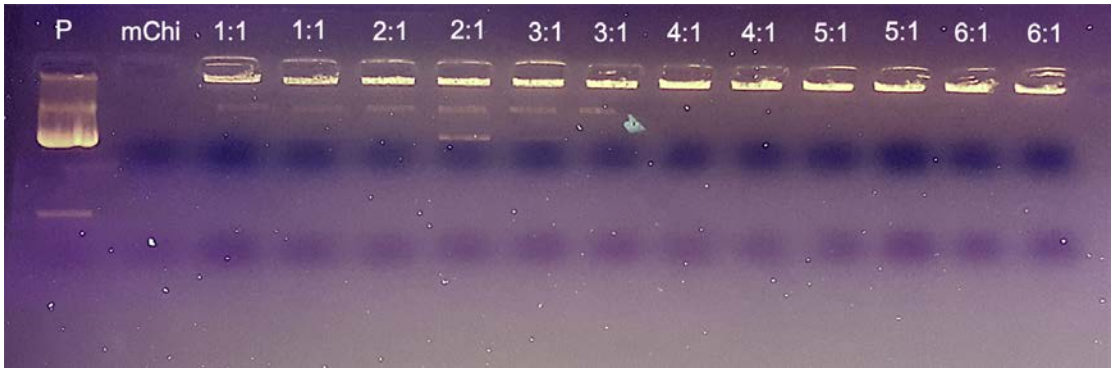
P: Plazmid;

Bu partiküle özgü olarak genin tamamının tutulduğu oran ve daha yüksek polimer içeren karışım oranlarında genin yükleme kuyusunda bile SYBR green ışıması görülmediği, genin polimer tarafından tamamen enkapsüle edilerek SYBR green ile temasının engellendiği, dolayısı ile UV ışık altında genin ışıma göstermediği tespit edildi (Şekil 4-2).

Maksimum gen taşıma kapasitesi belirlenen PBAE polimeri için zeta potansiyelleri de göz önüne alınarak 5:1, 8:1 ve 10:1 oranlarının hücre transfeksiyon çalışmalarında denenmesine karar verildi.

4.2.2.2. nmChi:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları

Sentezlenen nmChi (0,5 mg/mL konsantrasyonda) ve gen (1 mg/mL) süspansiyonları mg/mg cinsinden 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 10:1, 15:1, 20:1 ve 30:1 oranlarında karıştırılarak jel elektroforezde 110 V 30 dk yürütüldü. Jel elektroforez sonuçlarına göre 4:1 oranındaki karışımda ortamdaki genin tamamının nanopartikül tarafından tutulduğu belirlendi (Şekil 4-3).



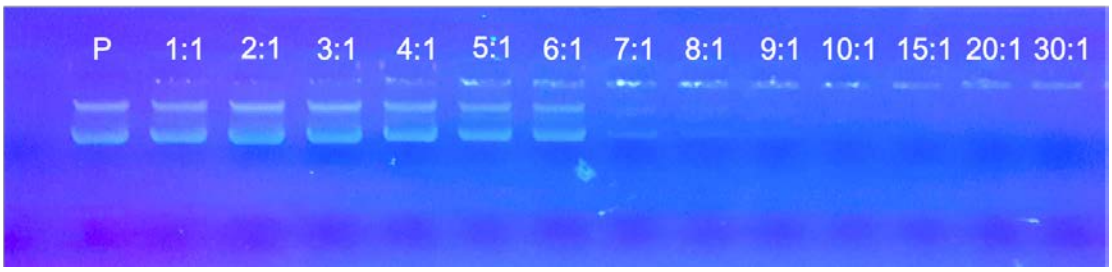
Şekil 4-3. nmChi:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü

P: Plazmid;

Maksimum gen taşıma kapasitesi belirlenen nmChi için zeta potansiyelleri de göz önüne alınarak 7:1, 9:1 ve 14:1 oranlarının hücre transfeksiyon çalışmalarında denenmesine karar verildi.

4.2.2.3. nLDH:Gen Taşıma Kapasitesi Optimizasyon Çalışmaları

Sentezlenen nLDH (3 µg/µL konsantrasyonda) ve gen (1 µg/µL) süspansiyonları mg/mg cinsinden 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 10:1, 15:1, 20:1 ve 30:1 oranlarında karıştırılarak jel elektroforezde 110 V 30 dk yürütüldü. Jel elektroforez sonuçlarına göre 9:1 oranındaki karışımda ortamdaki genin tamamının nanopartikül tarafından tutulduğu belirlendi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4. nLDH:gen karışımlarının jel elektroforez görüntüsü

P: Plazmid;

Maksimum gen taşıma kapasitesi belirlenen nmChi için zeta potansiyelleri de göz önüne alınarak 12:1, 15:1 ve 30:1 oranlarının hücre transfeksiyon çalışmalarında denenmesine karar verildi.

4.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Gen Transferi

4.3.1. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Transfeksiyon Optimizasyonu

PKF ve PKEF hücre hatlarının transfeksiyonunda nmChi, nLDH ve PBAE ile ticari Lipofectamine® transfeksiyon ajanı kullanıldı. Çalışmada kullanılan gen taşıyıcı sistemlerin PKF ve PKEF hücre hatlarında etkinlikleri bilinmediği ve yapılacak çalışmalarda standart sonuçların alınabilmesi için öncelikle yöntemlerin optimizasyon çalışmaları yapıldı.

Transfeksiyon optimizasyon çalışmalarında; nmChi için 7:1, 9:1 ve 14:1; LDH için 12:1, 15:1 ve 30:1; PBAE için 5:1, 8:1 ve 10:1 ve Lipofektamine® için 3:1, 4:1 ve 5:1 polimer:gen oranları 18 saat öncesinde 20.000 hücre ekilen 24 kuyucuklu petrilerde PKF ve PKEF hücrelerinde denendi. Patent çalışmaları sırasında belirlenen nmChi için 150 µg/mL konsantrasyonunun toksik etkisi bulunduğundan, denemelerde maksimum 70 µg/mL konsantrasyon çalışıldı. PBAE için ise 25 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlar toksik bulunduğundan, denemelerde maksimum 25 µg/mL konsantrasyon çalışıldı. LDH için Ladewig ve ark. (2010) yaptığı çalışma referans olarak kullanıldı ve denemelerde maksimum 40 µg/mL konsantrasyonun kullanılmasına karar verildi.

Transfeksiyon çalışmalarında kuyucuk başına kullanılan en yüksek gen taşıyıcı konsantrasyonları; nmChi için 21 µg/well, nLDH için 12 µg/well, PBAE için 7,5 µg/well, Lipofectamine® ticari uygulama dozu 3 µg/well olarak uygulandı. Bu şekilde kuyucuk başına polimer konsantrasyonları sabit tutularak, gen oranları yukarıda verilen oranlar doğrultusunda değiştirildi. Optimizasyon çalışmalarında altıncı ile dokuzuncu pasaj aralığındaki PKF ve PKEF hücreleri kullanıldı.

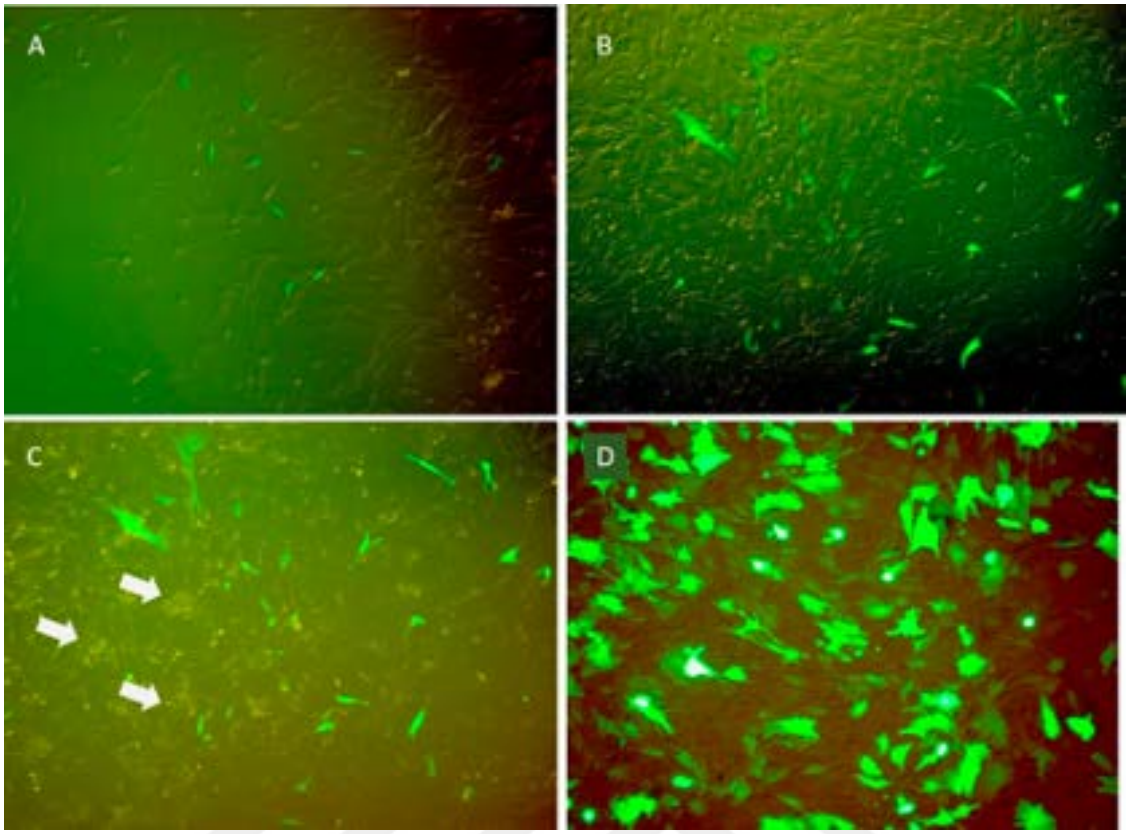
Yapılan ön denemeler sırasında transfeksiyondan 18 saat önce her bir kuyucuk içine ekilen hücre sayılarının da transfeksiyon etkinliği ve transfeksiyon sonrasında petrilerde kalan hücre sayıları açısından etkili olduğu belirlendi. Bu nedenle her bir kuyucuğa ekilmesi gereken optimum hücre sayısı da saptandı. Bu çalışmalarda tekrarlı olarak her bir kuyucuğa 20.000, 25.000, 30.000 ve 35.000 hücre ekilerek transfeksiyon etkinlikleri değerlendirildi. nmChi, nLDH, PBAE ve Lipofectamine® ile 3 tekrar deneme yapıldı ve 24 saat öncesinde 30.000 hücre ekiminin ertesi gün %70 oranında petri yüzeyini kapladığından (konfluensi oluşturduğu) transfeksiyonun daha başarılı olduğu ve hücreler açısından da daha sağlıklı görünümler elde edildiği gözlendi.

Gen taşıyıcı nanopartikül:gen oranlarının denendiği tekrarlı denemeler sonrasında, her polimer için kullanılacak uygun doz belirlenerek; nmChi, PBAE, LDH, Lipofectamine® ve kontrol grupları olmak üzere PKF ve PKEF hücrelerinde 5'er grup oluşturuldu ve 6'şarlı tekrarları yapıldı. Her bir taşıyıcı madde için, kuyucuk başına kullanılan toplam madde ve gen taşıyıcı madde:gen oranları;

- NmChi için, polimer:gen konsantrasyonu 7:1 (21 µg nmChi:3 µg plazmid/well),
- PBAE için, polimer:gen konsantrasyonu 7:1 (7,5 µg PBAE:1,07 µg plazmid/well),
- LDH için, polimer:gen konsantrasyonu 11:1 (12 µg LDH:1,09 µg plazmid/well),
- Lipofectamine® ticari uygulama dozu 3 µg/well, polimer:gen konsantrasyonu 3:1 (3 µg Lipofectamine®:1 µg plazmid/well)

oranlarında uygulandı. Kontrol grubu olarak da plazmid 1 µg/well konsantrasyonunda bir kuyucuğa eklendi.

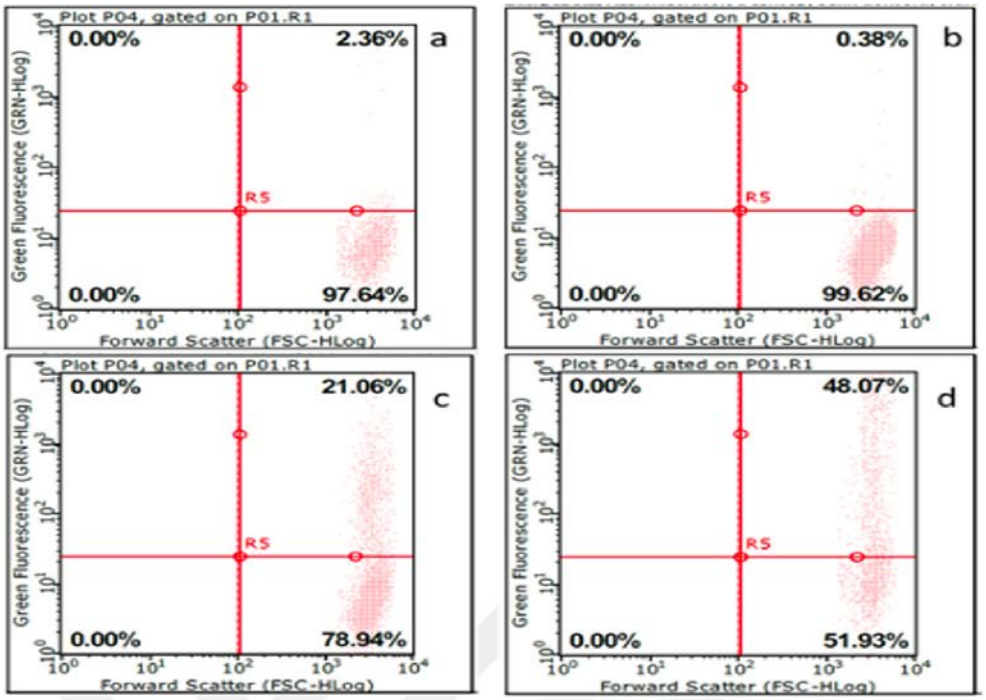
Planlanan çalışma ile 6 tekrar yapıldı. Çalışmada uygun yayılım gösteren petrilerdeki hücre kültür medyumu uzaklaştırıldı ve kuyucuklar PBS ile yıkandı. Hazırlanan nanopartikül-plazmid kompleksleri hücrelerin üzerine eklendi ve FCS içermeyen Optimem® medyumu kuyucuklara koyularak 4 saat inkübe edildi. Süre sonunda ortamdaki transfeksiyon medyumu uzaklaştırıldı ve %10 FCS içeren hücre kültür medyumu ortama eklendi. Petriler 37.5°C ve %95 neme doyurulmuş %5 CO2'li atmosfer ortamındaki inkübatörde 72 saat süre ile inkübe edilmek üzere bırakıldı. İnkübasyonun 24. saatinde rastgele iki gözde bulunan hücreler %0,25'lik Tripsin-EDTA ile kaldırılarak apoptoz ve membran bütünlüğü analizleri yapıldı. Transfeksiyon kontrolleri için 72 saatlik süre bitiminde floresan ataçmanlı invert mikroskop ile natif kontrolleri yapılan gruplarda sağlıklı bir yayılım görülmesi sonrasında, 488 nm dalga boyundaki floresan ışık altında yeşil floresan ışıma açısından kontrolleri gerçekleştirildi. Floresan mikroskop altında ışıma kontrolü yapıldıktan sonra, tüm deney grupları petriden kaldırılarak transfeksiyon etkinliği akış sitometrisi ile belirlendi.



Şekil 4-5. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası natif kontrollerdeki görüntü.

Yeşil ışıma gösteren hücreler transfeksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Ok işareti: Toksikasyon nedeniyle oluşan döküntüleri. A: PBAE deneme grubu, B: nmChi deneme grubu, C: LDH deneme grubu, D Lipofectamine® deneme grubu.

Transfeksiyon etkinliğini belirleyebilmek amacıyla, hücreler akış sitometrisinde 10.000 hücre saydırılarak değerlendirildi. Elde edilen grafik üzerinde GFP nedeni ile floresan ışıma yapan hücre popülasyonu belirlendi. Yeşil ışıma gösteren hücreler transfeksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Transfeksiyon analizlerinde PKF hücrelerinde yapılan çalışmalardaki bir uygulamanın plot grafikleri örnek olarak verilmiştir (Şekil 4-6).



Şekil 4-6. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen transfeksiyon plot grafikleri.

Grafik üzerinde oluşturulan alanlardan sağ üst tarafta yer alan hücreler trasnsfekte hücre populasyonu olarak değerlendirildi.
a: nmChi deneme grubu, b: LDH deneme grubu, c: PBAE deneme grubu, d: Lipofectamine® deneme grubu

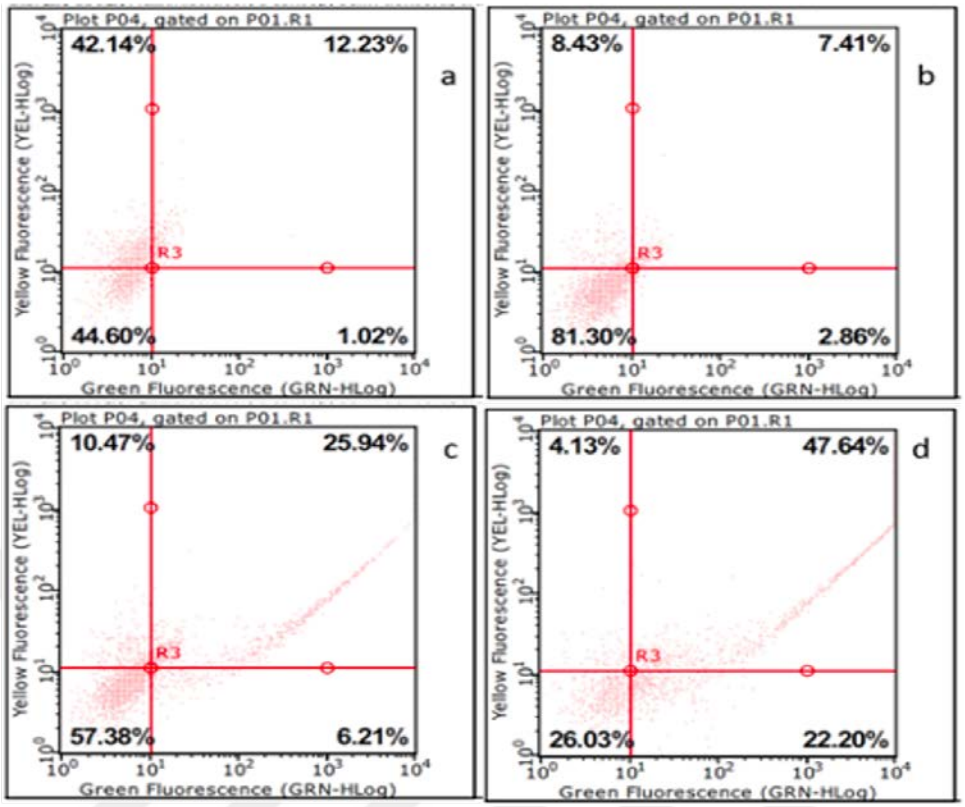
Transfeksiyon etkinliği optimizasyon çalışmalarında PKF hücre hattında yapılan tekrarlar sonucunda elde edilen ortalama transfeksiyon oranları Tablo 4-1'deki gibidir.

Tablo 4-1. PKF hücrelerinde transfeksiyon etkinliği oranları

Gruplar	Transfeksiyon Etkinliği Oranları (%)
Kontrol	$1{,}00 \pm 0{,}24^{c}$
nmChi	$3{,}63 \pm 1{,}37^{b}$
LDH	$1{,}69 \pm 0{,}59^{bc}$
PBAE	$8{,}40 \pm 3{,}40^{b}$
Lipofectamine®	$48{,}91 \pm 4{,}99^{a}$

abc Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0{,}05$, Mann-Whitney U analizi).

PKF hücrelerinde yapılan tekrarlı transfeksiyon çalışmalarında, Lipofectamine®'in en yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu görüldü. PBAE için ise transfeksiyon etkinliği düşük oranda olmasına karşın, transfekte hücrelerin diğer gruplara oranla daha sağlıklı olduğu görüldü.



Şekil 4-7. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen apoptoz plot grafikleri.

a: nmChi deneme grubu, b: LDH deneme grubu, c: PBAE deneme grubu, d: Lipofectamine® deneme grubu.

Tablo 4-2. PKF hücrelerinde apoptotik aktivite oranları

Gruplar	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları(%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre oranı
Kontrol	91,03±1,97^{a}	2,01±0,33^{c}	2,34±0,84^{d}	4,62±0,99^{bc}
nmChi	62,58±7,05^{cd}	2,18±0,79^{c}	11,97±2,98^{b}	23,27±6,55^{a}
LDH	83,20±4,47^{ab}	1,33±0,37^{d}	3,90±1,51^{cd}	11,57±3,42^{ab}
PBAE	75,58±3,93^{bc}	5,52±1,03^{b}	9,10±2,54^{bc}	9,79±2,11^{ab}
Lipofectamine®	36,06±5,50^{d}	22,70±1,57^{a}	37,16±6,26^{a}	4,08±0,50^{c}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$, Mann-Whitney U analizi).

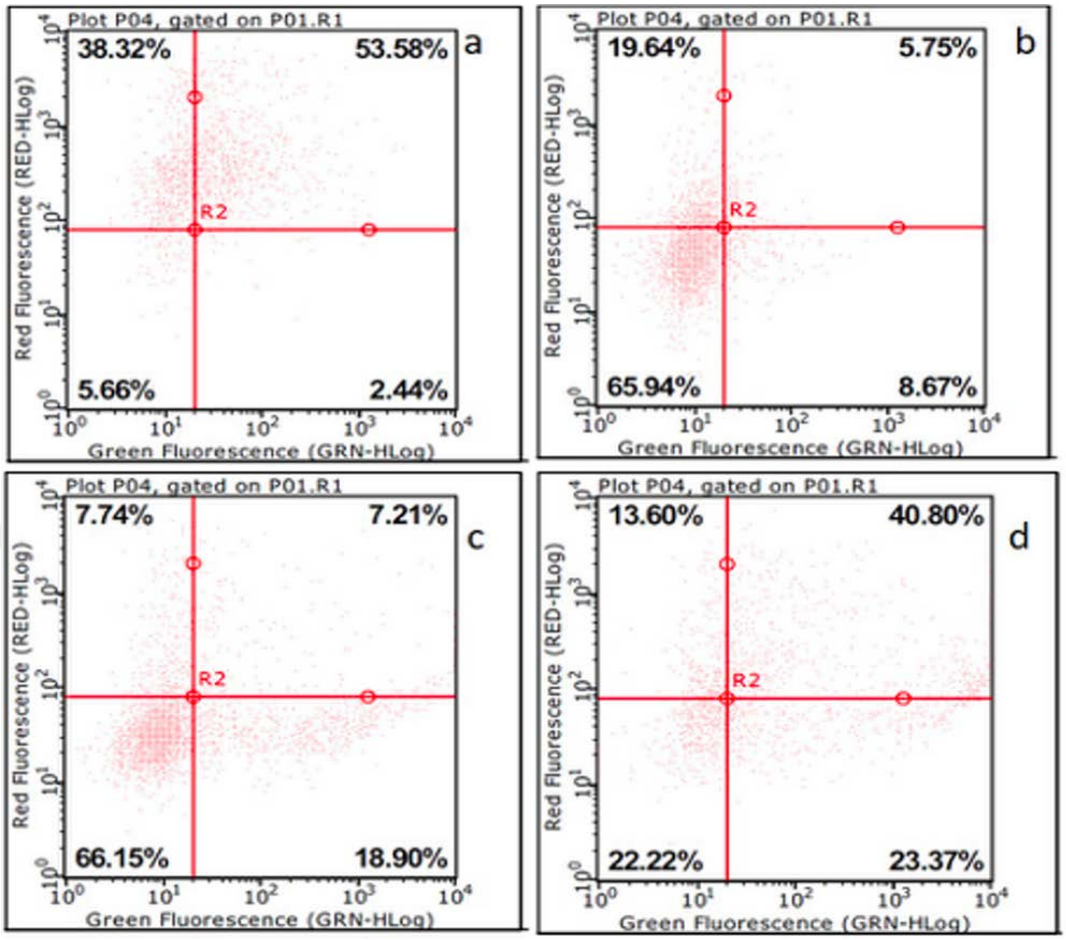
PKF hücrelerinde yapılan apoptoz analizlerinde, LDH grubunun Kontrol ile benzer canlılık oranları sağladığı, yine PBAE'nin de LDH ile benzer canlılık oranı sonuçlarını verdiği görüldü. nmChi'ın diğer gruplara göre hücrelerde çok daha fazla oranda ölüme sebep olduğu gözlendi ($p<0,05$). Ayrıca Lipofectamine® grubunun 24. saatte transfeksiyon oluşturmaya başlamasına rağmen, erken dönemde transfekte olan hücrelerde yoğun apoptoz oluşturduğu dikkat çekmektedir ($p<0,05$). Bu sonuç ile de, etkinliği fazla olmasına karşın hücre hasarlarının özellikle DNA hasarlarının Lipofectamine® grubunda daha fazla olduğu belirlendi ($p<0,05$). Transfeksiyon sonrası apoptoz analizlerinde PKF hücrelerinde yapılan çalışmalardaki bir uygulamanın plot grafikleri örnek olarak verilmiştir (Şekil 4-7).

Tablo 4-3. PKF hücrelerinde membran bütünlüğü oranları.

Gruplar	Canlı Hücreler		Ölü Hücreler	
	Sağlam Membran Oranı (%)	Hasarlı Membran Oranı (%)	Sağlam Membran Oranı (%)	Hasarlı Membran Oranı(%)
Kontrol	78,29±3,55^{a}	6,37±2,49^{bc}	11,62±2,13^{b}	3,71±0,94^{bc}
nmChi	30,14±3,28^{b}	3,17±1,09^{c}	53,60±3,17^{a}	14,09±4,86^{ab}
LDH	52,57±13,58^{ab}	5,82±2,60^{bc}	38,04±15,27^{ab}	3,56±0,50^{c}
PBAE	73,52±1,76^{a}	12,61±3,27^{ab}	9,63±1,65^{b}	4,23±0,63^{bc}
Lipofectamine®	41,31±5,21^{b}	23,40±3,99^{a}	11,34±2,43^{b}	23,94±5,02^{a}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$, Mann-Whitney U analizi).

PKF hücrelerinde yapılan membran bütünlüğü analizlerinde, PBAE grubunda Kontrol grubundaki hücrelere benzer şekilde membranı sağlam canlı hücre oranının yüksek olduğu ve diğer gruplarla arasındaki farkların önemli olduğu görüldü ($p<0,05$). NmChi ve LDH gruplarında ölü hücre oranlarının önemli deredece fazla olduğu ($p<0,05$), Lipofectamine® grubunda ise canlı fakat membranı hasarlı hücre oranlarının yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Transfeksiyon sonrası membran bütünlüğü analizlerinde, PKF hücrelerinde yapılan çalışmalardaki bir uygulamanın plot grafikleri örnek olarak verilmiştir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8. PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen membran bütünlüğü plot grafikleri.

a: nmChi deneme grubu, b: LDH deneme grubu, c: PBAE deneme grubu, d: Lipofectamine® deneme grubu.

Transfeksiyon etkinliği optimizasyon çalışmalarında PKEF hücre hattında yapılan tekrarlar sonucunda elde edilen ortalama transfeksiyon oranları Tablo 4-4'de verilmiştir.

Tablo 4-4. PKEF hücrelerinde transfeksiyon etkinliği oranları (%).

Gruplar	Transfeksiyon Etkinliği Oranı (%)
Kontrol	$1,24\pm0,12^{c}$
nmChi	$3,15\pm0,58^{b}$
PBAE	$2,64\pm0,58^{b}$
LDH	$1,65\pm0,49^{bc}$
Lipofectamine®	$51,35\pm5,32^{a}$

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$, Mann-Whitney U analizi).

PKEF hücrelerinde yapılan transfeksiyon çalışmasında, Lipofectamine® dışındaki grupların transfeksiyon oluşturmada başarısız olduğu görüldü ($p<0,05$). Bu uygulamalardaki apoptoz oranları Tablo 4-5'de verildi.

Tablo 4-5. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası apoptotik aktivite oranları

Gruplar	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları(%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre)
Kontrol	87,73±1,18^{a}	0,66±0,09^{c}	0,56±0,10^{d}	11,05±1,25^{b}
nmChi	66,79±4,13^{b}	0,36±0,03^{c}	4,97±1,00^{b}	27,87±3,75^{a}
PBAE	87,91±1,40^{a}	1,77±0,27^{b}	1,96±0,24^{c}	8,36±1,16^{bc}
LDH	85,64±2,50^{a}	1,10±0,40^{bc}	1,40±0,32^{c}	11,87±1,84^{b}
Lipofectamine®	33,60±3,89^{c}	29,28±3,63^{a}	30,77±3,01^{a}	6,34±1,73^{c}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$, Mann-Whitney U analizi).

PKEF hücrelerinde yapılan apoptoz analizlerinde, PBAE ve LDH polimerlerinin Kontrol grubundaki hücrelerle benzer canlı hücre, erken ve geç apoptoz sonuçları verdikleri, nmChi'nin diğer gruplara göre hücrelerde önemli derecede ölüme sebep olduğu görüldü ($p<0,05$). Ayrıca Lipofectamine® grubunun 24. saatte yeşil floresan proteini (green floresan proteini, GFP) ifadesi oluşturmaya başlamasına rağmen, canlı hücre sayısının en düşük olduğu ($p<0,05$) ve erken dönemde transfekte olan hücrelerde yoğun apoptoz oluşturduğu gözlendi ($p<0,05$; Tablo 4-5).

PKEF hücrelerinde yapılan membran bütünlüğü analizlerinde, PBAE grubunda elde edilen membranı sağlam canlı hücre oranlarının kontrol grubuyla benzer olduğu saptantı ($p>0,05$). nmChi ve LDH gruplarında ölü hücre oranlarının fazla olduğu ($p<0,05$), Lipofectamine® grubunda ise canlı fakat membranı hasarlı hücre oranının daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$; Tablo 4-6).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, hücrelerde canlılık, membran ve DNA hasarları açısından kontrol grubu ile benzer sonuçlar gösterdiğinden dolayı PBAE ve pozitif kontrol olarak da Lipofectamine® ile devam edilmesine karar verildi. PBAE

transfeksiyon etkinliğinin beklenenin altında olması nedeniyle etkinliğin artırılması için, PBAE tekrar sentezletilerek yeniden optimizasyon çalışması yapıldı.

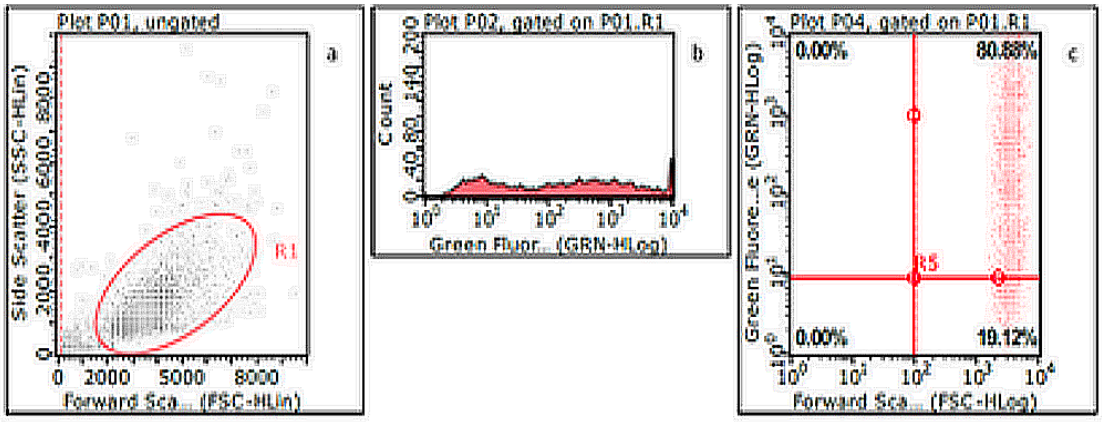
Tablo 4-6. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası membran bütünlüğü oranları

GRUPLAR	Canlı Hücreler		Ölü Hücreler	
	Sağlam Membran Oranı (%)	Hasarlı Membran Oranı (%)	Sağlam Membran Oranı (%)	Hasarlı Membran Oranı (%)
Kontrol	61,26±3,96^{a}	17,27±4,50^{ab}	14,59±2,10^{bc}	6,88±1,43^{bc}
nmChi	19,83±3,96^{b}	3,63±0,20^{bc}	57,21±2,63^{a}	19,50±4,55^{ab}
PBAE	72,68±3,33^{a}	9,90±2,23^{b}	12,12±0,70^{c}	5,29±1,11^{c}
LDH	34,83±8,21^{b}	3,40±1,42^{c}	55,84±10,58^{a}	5,92±2,14^{c}
Lipofectamine®	31,44±3,48^{b}	22,03±2,56^{a}	18,13±2,47^{b}	28,40±3,15^{a}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$, Mann-Whitney U analizi).

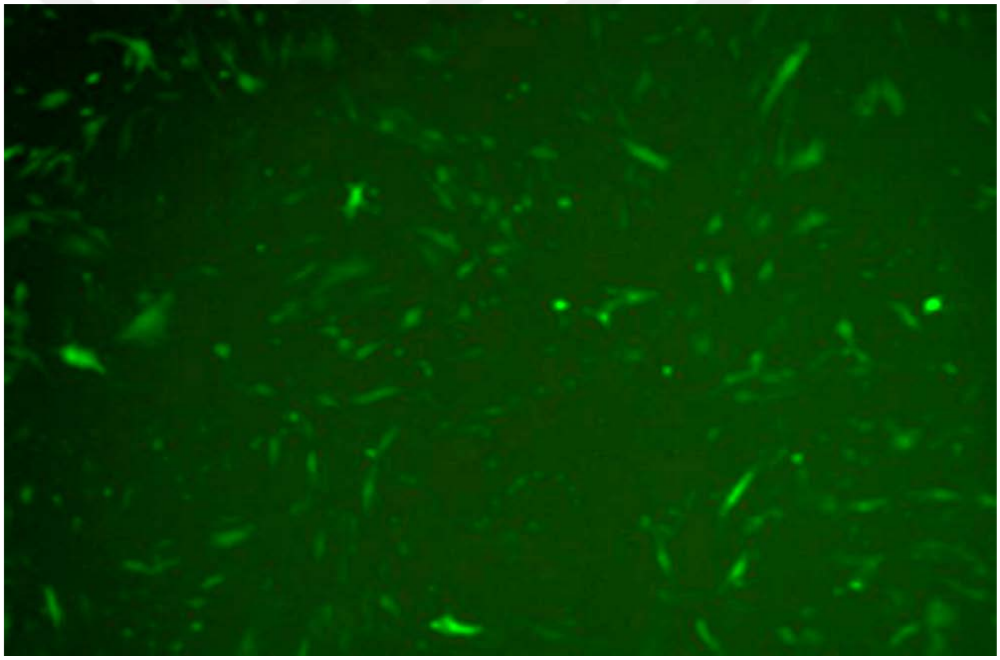
Transfeksiyon etkinliklerinin düşük olması, hücrelerde çok yüksek oranlarda hasar oluşturması (Tablo 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, 4-6) ve sentez aşamasında da yeni bazı değişiklikler yapılması gerektiğinden; nmChi ve LDH nanopartikülleri ile transfekte hücre üretimine devam edilmeme kararı verildi. Ayrıca, bu karar verilirken hücrelerde istenilen düzeyde transfeksiyon oluşturamayan, apoptoz oranları yüksek olan partiküllerle sağlıklı klon embriyo üretilmesinin mümkün olamayacağı da göz önünde bulunduruldu.

Transfeksiyon etkinliği optimizasyon çalışmalarında PKF ve PKEF hücre hatlarında yapılan tekrarlar sonucunda elde edilen ortalama transfeksiyon oranları PBAE'de düşük olmasına karşın, hücre apoptoz ve membran bütünlüğü oranlarının çok iyi sonuç vermesi nedeniyle nanopartikül gen kompleksinin hücre üzerine uygulanmasında yapılan değişiklikler (genin karıştırılması, hücrelerin yüzeyine eklenme yöntemi, hücre yoğunluğu vb. uygulama değişiklikleri) sonucunda transfeksiyon etkinlikleri yükseltilerek yaklaşık %80'ler civarına getirildi (Şekil 4-9 ve Şekil 4-10).



Şekil 4-9. Yöntemdeki iyileştirmeler sonrasında PKF hücre hattında PBAE ile transfeksiyon sonrası akış sitometrisinde elde edilen transfeksiyon plot grafikleri.

a: Seçilen hücre populasyonu, b: GFP ifadesi grafiği, c: Transfeksiyon plot grafiği

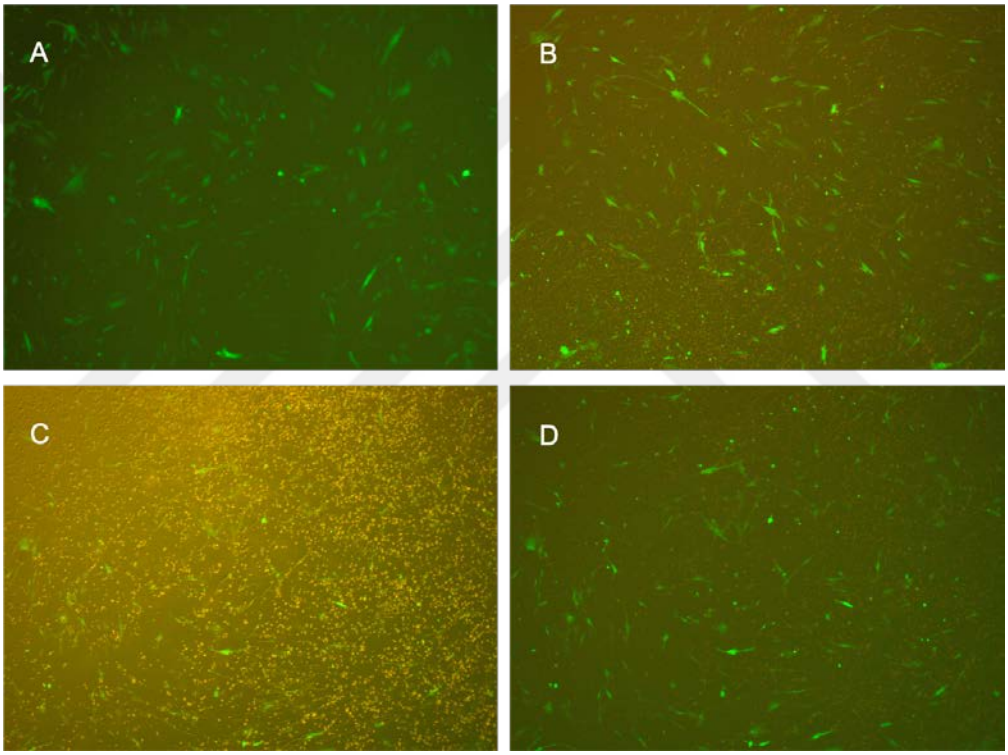


Şekil 4-10. Yöntemdeki iyileştirmeleri takiben PKF hücre hattında transfeksiyon sonrası hücrelerin natif kontrolünde gözlemlenen yeşil ışıma.

4.3.2. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Seleksiyon Optimizasyonu

Seleksiyon amacıyla, PKF ve PKEF hücre hatlarında transfeksiyon sonrası, transgenik olmayan hücrelerin yüksek antibiyotik içeren ortamda ölümlerinin sağlanması hedeflendi. Çalışmada kullanılmak üzere, G418 ticari seleksiyon ajanı temin edildi ve etkin dozu belirlemek amacıyla transfekte PKEF hücrelerinde denemeler yapıldı. Literatür araştırmaları sonucunda (Shin ve ark., 2006; Liu ve ark., 2018a) 400, 600, 800

ve 1000 µg/µL dozları belirlenerek, Neomisin antibiyotiğine benzer etkiye sahip G418 seleksiyon ajanı transfekte PKEF hücrelerinin besi ortamlarına eklendi ve 14 gün süre ile inkübe edilerek etkileri gözlendi. Transfeksiyonda kullanılan pEGFP-N1 plazmidinde neomisin direnç geni bulunduğundan, G418 ticari seleksiyon ajanına karşı transfekte olan hücreler direnç gösterdi ve transfekte olmayan hücrelerde inkübasyonun 5. gününden itibaren ölümler görülmeye başlandı. Hücre ölümlerinin durduğu ve sağlıklı transfekte hücrelerin petri tabanında kaldığı popülasyon belirlenene kadar hücreler 14 gün süre ile takip edildi (Şekil 4-11).



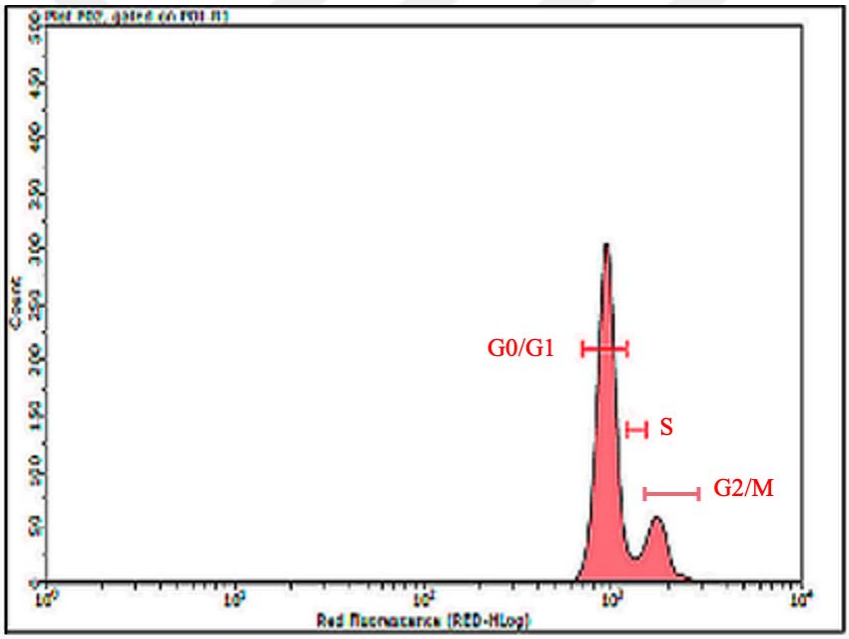
Şekil 4-11. Transfekte PKF hücre hattında G418 ile yapılan seleksiyon sonrası görüntüler.

A: Transfekte PKF hücrelerinin 1.gün görüntüsü
B: Transfekte PKF hücrelerinin 5.gün görüntüsü
C: Transfekte PKF hücrelerinin 7.gün görüntüsü, zeminden kalkmış sarı renkte döküntü şeklinde ölü hücreler
D: Transfekte PKF hücrelerinin 7.gün görüntüsü, zeminde tutunmakta olan yeşil ışıma gösteren transfekte hücreler

Sonuçlar değerlendirildiğinde 800 ve 1000 µg/µL dozlarında transfekte hücre topluluklarının daha yoğun olarak bulunduğu, fakat 800 µg/µL dozunda hücrelerin daha sağlıklı görülmesi nedeniyle 800 µg/µL oranının seleksiyon amacıyla kullanılmasına karar verildi.

4.3.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Hücre Siklusu Senkronizasyonu Optimizasyonu

Hücre sikluslarının yeniden programlanması için kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma, Roscovitine ve Trichostatin A uygulamaları, yöntemlerin optimizasyonu için öncelikle transfekte olmayan PKF ve PKEF hücre hatlarında denendi. Elde edilen sonuçlar akış sitometrisinde analiz edilerek Roscovitine ve Trichostatin A inhibitörleri için uygun konsantrasyon oranları belirlendi. Elde edilen bulguların açlık ve kontakt inhibisyon grupları ile karşılaştırmalı olarak analizleri yapıldı. Akış sitometrisinde yapılan hücre siklus senkronizasyon analizlerine PKF hücrelerinde yapılan çalışmalardaki bir uygulamanın histogram grafiği örnek olarak verildi (Şekil 4-12).



Şekil 4-12. PKF hücre hattında hücre senkronizasyonu sonrası akış sitometrisinde elde edilen hücre siklusu senkronizasyonu histogram grafiği.

4.3.3.1. Roscovitine Doz Uygulaması

Uygun Roscovitine dozunun belirlenmesi için 10, 15, 20 ve 30 µM oranları PKF ve PKEF hücre hatlarında 6 tekrarlı olarak denendi ve 24 saat bekletme sonrasında apoptoz ve hücre siklus analizleri yapıldı.

Tablo 4-7. PKEF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları.

Roscovitine Dozları	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılımları Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
10 µM	44,38 [bc]	13,35 [a]	30,51
15 µM	48,55 [ab]	10,80 [b]	29,17
20 µM	49,96 [a]	9,68 [bc]	29,00
30 µM	40,95 [c]	9,00 [c]	31,77

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD).

Tablo 4-8. PKEF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları.

Roscovitine Dozları	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları(%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre Oranı
10 µM	90,84 [a]	0,47 [b]	1,19 [b]	6,52
15 µM	92,64 [a]	0,58 [b]	2,09 [b]	4,69
20 µM	90,58 [a]	1,22 [b]	2,32 [b]	4,73
30 µM	79,87 [b]	4,62 [a]	7,62 [a]	7,52

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05,Oneway ANOVA Tukey HSD).

PKEF hücrelerinde alınan sonuçlara bakıldığında, genel olarak Roscovitine uygulamasının hücrelerde düşük oranlarda G0/G1 sonuçları verdiği gözlendi. Bununla birlikte en iyi sonucun 20 µM Roscovitine uygulanan grupta olduğu (%49,96) , 15 µM Roscovitine kullanılan grupta da benzer oranların şekillendiği (p>0,05), bu grupların 10 ve 30 µM Roscovitine uygulanan gruplara göre daha iyi (p<0,05) sonuçlar verdiği görüldü. Apoptotik hücreler değerlendirildiğinde 10, 15 ve 20 µM dozların benzer ve 30 µM uygulamasına göre daha yüksek canlı hücre oranlarını verdiği görüldü (p<0,05). Hücre siklusu ve apoptoz verileri beraber değerlendirildiğinde (Tablo 4-7 ve Tablo 4-8), elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak Roscovitine'in 15 µM dozu ile devam edilmesine karar verildi.

Tablo 4-9. PKF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları

Roscovitine Dozları	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı)	G2/M Fazı
10 µM	57,32	5,03 [a]	29,04 [c]
15 µM	58,41	3,83 [b]	29,68 [bc]
20 µM	57,00	2,70 [c]	32,13 [a]
30 µM	55,26	3,41 [b]	31,19 [ab]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD).

Tablo 4-10. PKF hücrelerinde farklı Roscovitine dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları

Roscovitine Dozları	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları(%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
10 µM	75,73	3,56	2,12	1,92
15 µM	88,97	4,75	2,34	3,93
20 µM	87,95	4,72	3,66	3,67
30 µM	85,86	5,95	3,83	4,65

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD).

PKF hücrelerinde yapılan uygulama sonrasında, hücre siklusu ve apoptoz değerlendirildiğinde dozlar arasında istatistik olarak anlamlı fark olmadığı görüldü (Tablo 4-9 ve Tablo 4-10). PKF hücrelerinde G0/G1 fazında yüzde değerinde daha yüksek sonuçlar elde edilmekle beraber, sonuçların PKEF hücrelerine yakın olduğu görüldüğünden Roscovitine 15 µM dozu ile devam edilmesine karar verildi.

4.3.3.2. Trichostatin A Doz Uygulaması

Hücre siklusunu senkronize edilebilmek için uygun Trichostatin A dozunun belirlenebilmesi amaçlı 25, 50, 75 ve 100 nM oranları PKF ve PKEF hücrelerinde 6 tekrarlı olarak denendi ve 24 saat bekletme sonrasında apoptoz ve hücre siklus analizleri yapıldı. Elde edilen değerlerin istatistik analizleri yapılarak doz seçimine gidildi.

Tablo 4-11. PKEF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları.

Trichostatin A Dozları	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
25 nM	56,53 [b]	10,37 [a]	24,02 [a]
50 nM	70,53 [a]	5,16 [b]	19,25 [b]
75 nM	69,77 [a]	3,76 [c]	16,20 [c]
100 nM	70,05 [a]	3,53 [c]	15,82 [c]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

Tablo 4-12. PKEF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları

Trichostatin A Dozları	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları (%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
25 nM	68,22 [b]	0,37 [b]	1,43 [b]	13,30 [a]
50 nM	90,89 [a]	1,18 [a]	2,45 [ab]	5,47 [b]
75 nM	85,06 [ab]	1,13 [ab]	3,50 [a]	10,31 [ab]
100 nM	86,36 [ab]	1,12 [ab]	3,23 [a]	9,29 [ab]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKEF hücrelerinde çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde, Trichostatin A'nın 50, 75 ve 100 nM dozlarının G0/G1 fazı ve canlı hücre (DNA hasarı oluşmamış, intakt hücre) oranlarında istatistik olarak benzer sonuçlar verdiği, 25 nM Trichostatin A konsantrasyonu kullanıldığında daha düşük G0/G1 ve daha düşük canlı hücre oranı elde edildiği (p<0,05) görüldü. Canlı hücre ve ölü hücre oranları açısından yine 25 nM konsantrasyonun 50 nM konsantrasyona göre önemli derecede düşük sonuçlar verdiği görülmüştür (p<0,05). Hücre siklusu ve apoptoz verileri beraber değerlendirildiğinde (Tablo 4-11 ve Tablo 4-12), yüzde olarak 50 nM dozunun daha iyi sonuç verdiği gözlenerek bu dozla devam edilme kararı alındı.

PKF hücrelerinde çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde, Trichostatin A'nın 50, 75 ve 100 nM dozlarının G0/G1 fazı oranlarında istatistik olarak benzer sonuçlar verdiği, 25 nM konsantrasyonun kullanılmasıyla daha düşük G0/G1 oranı elde edileceği (p<0,05), canlı hücre (DNA hasarı oluşmamış, intakt hücre) oranlarında ise istatistik olarak dozlar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü (p>0,05). Hücre siklusu ve apoptoz verileri

beraber değerlendirildiğinde (Tablo 4-13 ve Tablo 4-14), PKEF hücreleri örnek alınarak yüzde olarak 50 nM dozu daha iyi sonuç verdiğinden bu dozla devam edilme kararı alındı.

Tablo 4-13. PKF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları

Trichostatin A Dozları	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
25 nM	61,52 [b]	5,12 [a]	26,40
50 nM	65,86 [a]	3,48 [b]	26,20
75 nM	66,09 [a]	2,85 [bc]	26,49
100 nM	67,46 [a]	2,31 [c]	26,59

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

Tablo 4-14. PKF hücrelerinde farklı Trichostatin A dozlarına göre elde edilen apoptotik aktivite oranları

Trichostatin A Dozları	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları (%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre Oranı
25 nM	59,30	1,78	2,78 [b]	2,81
50 nM	84,61	3,56	5,02 [ab]	6,81
75 nM	80,87	3,55	6,35 [a]	9,23
100 nM	77,79	3,61	5,36 [ab]	13,24

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

4.3.3.3. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Hücre Siklus Gruplarının Karşılaştırmalı Analizleri

Senkronizasyon için kullanılacak olan kimyasalların dozları belirlendikten sonra senkronizasyon gruplarının denemelerine başlandı. Kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma, 15 µM Roscovitine ve 50 nM Trichostatin A kimyasal ajanları PKF ve PKEF hücrelerinde 6 tekrarlı uygulandı.

Tablo 4-15. PKEF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücre sikluslarına göre hücre dağılım değerleri

GRUPLAR	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
Kontakt İnhibisyon	68,78 [b]	5,60 [b]	13,93 [b]
Serum Açlığı	83,71 [a]	2,94 [a]	10,10 [a]
Trichostatin A 50 nM	70,53 [b]	5,16 [b]	19,26 [c]
Roscovitine 15 µM	48,55 [c]	10,80 [c]	29,17 [d]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

Tablo 4-16. PKEF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücrelerdeki apoptotik aktivite oranları

GRUPLAR	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları(%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
Kontakt İnhibisyon	88,85	2,71 [a]	2,14	6,30
Serum Açlığı	88,83	0,87 [b]	2,62	7,68
Trichostatin A 50 nM	90,89	1,18 [b]	2,45	5,47
Roscovitine 15 µM	92,64	0,58 [b]	2,09	4,69

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD).

PKEF hücrelerinde yapılan tekrarlı denemelerde, hücre siklus dağılımlarına bakıldığında serum açlığına bırakma grubunun en yüksek G0/G1 oranlarını verdiği ve bunu kontakt inhibisyon ve Trichostatin A gruplarının takip ettiği görüldü (p<0,05; Tablo 4-15). Roscovitine grubunda G0/G1 fazı hücre oranları açısından en düşük sonuçlar elde edildi (p<0,05). Canlı hücre oranları gruplar arasında benzer çıkarken, kontakt inhibisyonun hücrelerde daha yüksek oranda erken apoptoz oluşturduğu görüldü (p<0,05; Tablo 4-16).

PKF hücrelerinde yapılan denemelerde, serum açlığına bırakma ile en yüksek G0/G1 oranları elde edildi. Bu grubu Trichostatin A ve Kontakt inhibisyon gruplarının takip etti (Tablo 4-17). Canlı hücrelere bakıldığında gruplar arasında benzerlik olduğu, serum açlığına bırakma grubunun ise geç apoptoz oranlarının önemli derecede yüksek olduğu görüldü (p<0,05; Tablo 4-18).

Tablo 4-17. PKF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücre sikluslarına göre hücre dağılım oranları

GRUPLAR	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
Kontakt İnhibisyon	61,74 [c]	4,13 [a]	29,80 [a]
Serum Açlığı	71,09 [a]	1,84 [b]	20,61 [c]
Trichostatin A 50 nM	65,86 [b]	3,48 [a]	26,20 [b]
Roscovitine 15 µM	58,41 [d]	3,83 [a]	29,68 [a]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

Tablo 4-18. PKF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon gruplarının karşılaştırmalı analizlerinde hücrelerdeki apoptotik aktivite oranları

GRUPLAR	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları (%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
Kontakt İnhibisyon	87,33	5,11	2,93 [bc]	4,62
Serum Açlığı	82,97	2,49	7,69 [a]	6,85
Trichostatin A 50 nM	84,61	3,56	5,02 [b]	6,81
Roscovitine 15 µM	88,97	4,75	2,34 [c]	3,93

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0,05, Oneway ANOVA Tukey HSD)

4.3.3.4. PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Metilasyon Analizi Optimizasyonu

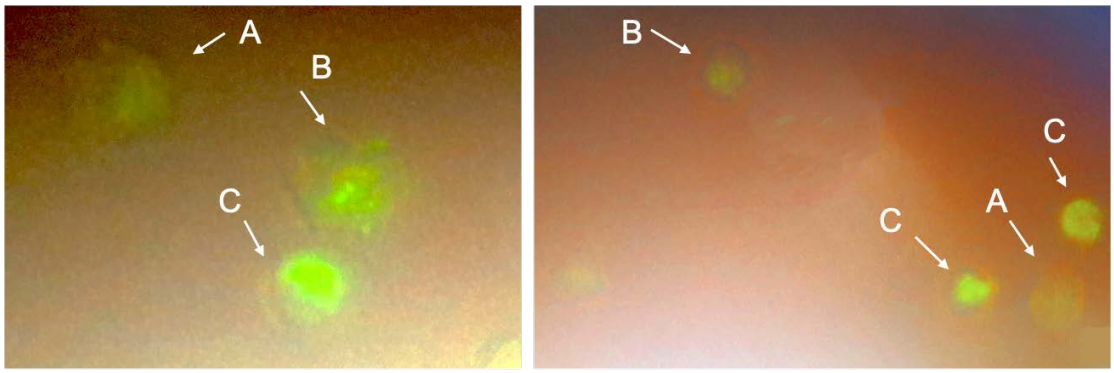
PKF ve PKEF hücre hatlarında, DNA metilasyon seviyelerinin antikorlar aracılığıyla immun boyama yapılarak çalışılabilmesi için kullanılacak primer ve sekonder antikorların tespiti, antikor oranlarının belirlenmesi, fiksasyon, permeabilizasyon aşamalarının iyileştirilebilmesi için optimizasyon yapıldı.

Transfekte olmayan normal PKF ve PKEF hücrelerinde DNA metilasyon analizlerinde Monoclonal anti-5-methylcytosine (33D3) antibody ve anti-mouse IgG FITC konjugatı kullanıldı dır. Kullanılan antikor ve konjugat miktarlarının minimum değerde tutulabilmesi için farklı hücre konsantrasyonlarında denenen antikor oranları Tablo 4-19'de verilen oranlarda denendi.

Tablo 4-19. Metilasyon analizinde denemesi yapılan primer ve sekonder antikor oranlarının hücre konsantrasyonları

Hücre Konsantrasyonu	Primer Antikor Oranı	Sekonder Antikor Oranı
500.000 hücre/ml	1:60 1:40 1:60	1:100 1:100 1:50
1.000.000 hücre/ml	1:60 1:40 1:60 1:40	1:100 1:100 1:50 1:50
2.000.000 hücre/ml	1:60 X2 1:40 X2 1:60 X2 1:40 X2	1:100 X2 1:100 X2 1:50 X2 1:50 X2

Yapılan denemeler sonrasında, çok aşamalı prosedürlerde 500.000 hücre/mL'de hücre konsantrasyonunun ve 1:60 Primer Antikor ile 1:100 Sekonder Antikor dilüsyon oranının analizler için yeterli olduğu görüldü. Yapılan denemeler sırasında FITC konjugatlı antikor ile işaretlenen hücreler floresan ataçmanlı mikroskopta görüntülendi (Şekil 4-13).

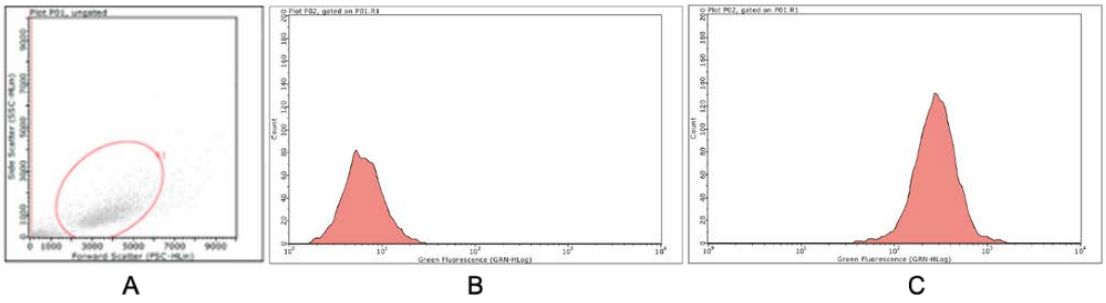


Şekil 4-13. FITC konjugatlı antikor ile işaretlenen hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü.

A: Düşük derecede metillenmiş hücre görüntüsü,
B: Orta derecede metillenmiş hücre görüntüsü,
C: Yüksek derecede metillenmiş hücre görüntüsü.

Çalışmada daha düşük yoğunlukta hücreler ile çalışılacağından dolayı, hücre kaybının önlenmesi için yapılan fiksasyon aşamasına iyileştirme yapıldı. Yapılan optimizasyonlar sonucunda çalışmada kullanılacak olan protokol belirlendi. Akış

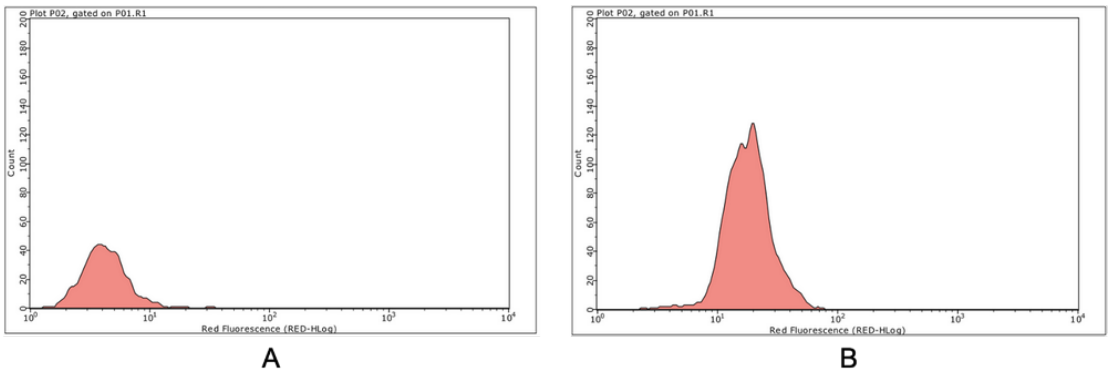
sitometrisinde DNA metilasyon analizlerinin PKF hücrelerindeki histogram grafiklerine örnek olarak Şekil 4-14 verilmiştir.



Şekil 4-14. PKF hücre hattında DNA metilasyon protokolü optimizasyonunun akış sitometrisinde elde edilen histogram grafiği.

A: seçilen hücre popülasyonu, B: immun boyama öncesi metilasyon düzeyi, C: immun boyama sonrası metilasyon düzeyi

Metilasyon optimizasyon çalışmasında, transfekte olmayan PKF ve PKEF hücreleri kullanıldı. Denemelerde kullanılan konjugatın FITC ifadesi, transfekte hücrelerdeki GFP ifadesi ile aynı dalga boyu aralığına denk geldiğinden, transfekte hücrelerde çalışırken aynı sekonder antikorun 594 nm bandında ışıma gösteren konjugatla işaretlenmiş olanı kullanıldı (Şekil 4-15).



Şekil 4-15. Transfekte PKF hücre hattında DNA metilasyonunun akış sitometrisinde elde edilen histogram grafiği.

A: immun boyama öncesi metilasyon düzeyi, B: immun boyama sonrası metilasyon düzeyi

4.4. Transfekte PKF ve PKEF Hücre Hatlarında Yeniden Programlama Analiz Sonuçları

Tablo 4-20. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik aktivite oranları

GRUPLAR	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları (%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
Kontrol	84,04±1,07^{a}	3,68±0,54^{def}	1,50±0,24^{c}	10,77±1,36^{b}
PBAE Kontrol	74,14±9,56^{de}	1,80±0,83^{f}	1,91±1,25^{c}	22,14±8,53^{a}
PBAE Trichostatin A	76,96±6,71^{bcde}	2,55±0,68^{ef}	1,94±1,27^{c}	18,55±6,20^{a}
PBAE Roscovitine	74,90±4,16^{de}	3,48±1,58^{def}	2,59±1,73^{c}	19,02±3,43^{a}
PBAE Serum Açlığına Bırakma	76,79±2,25^{cde}	7,90±2,81^{bc}	4,82±1,42^{b}	10,49±2,12^{b}
PBAE Kontakt İnhibisyon	83,73±2,66^{a}	5,10±0,74^{cde}	1,64±0,45^{c}	9,54±2,77^{b}
Lipofectamine® Kontrol	83,13±4,01^{abc}	6,24±2,74^{bcd}	2,59±1,62^{c}	8,04±3,33^{b}
Lipofectamine® Trichostatin A	84,17±4,58^{a}	7,36±4,06^{bc}	1,16±0,39^{c}	7,30±3,18^{b}
Lipofectamine® Roscovitine	80,45±6,13^{abcd}	8,37±2,46^{b}	2,74±1,29^{c}	8,43±5,11^{b}
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	71,97±1,44^{e}	12,95±1,18^{a}	6,67±1,35^{a}	8,41±1,26^{b}
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	83,57±1,67^{ab}	6,93±0,56^{bc}	1,27±0,23^{c}	8,23±1,34^{b}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik hücre dağılımlarına bakıldığında; canlı hücre oranlarının PBAE Kontakt İnhibisyon, Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon, Lipofectamine® Trichostatin A gruplarının Kontrol grubuyla benzer oranda yüksek canlılık oranları verdiği görüldü ($p \leq 0,01$). Bu grupları PBAE Trichostatin A ve Lipofectamine® Roscovitine grupları takip etti. Erken apoptozis oranlarına bakıldığında; Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma grubunun en yüksek oranları verdiği ($p \leq 0,01$) ve bunu PBAE Serum Açlığına Bırakma, Lipofectamine® kontrol, Lipofectamine® Trichostatin A, Lipofectamine® Roscovitine ve Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon gruplarının takip ettiği görüldü. Geç

apoptozis oranlarına bakıldığında; yine serum açlığına bırakmanın iki transfeksiyon ajanında da yüksek oranlar verdiği gözlendi (p≤0,01). Ölü hücre oranlarına bakıldığında ise; PBAE kontrol, PBAE Trichostatin A ve PBAE Roscovitine gruplarının en yüksek oranları verdiği görüldü (p≤0,01). Bu grupların dışında kalan diğer grupların Kontrol grubuyla benzer sonuçlar verdiği belirlendi(Tablo 4-20).

Tablo 4-21. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklusları dağılım oranları

GRUPLAR	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
Kontrol	54,39±1,30^{f}	9,90±0,55^{a}	35,70±0,88^{a}
PBAE Kontrol	76,09±2,48^{e}	4,18±0,58^{c}	16,11±1,87^{bc}
PBAE Trichostatin A	83,49±1,65^{bcd}	1,84±0,33^{ef}	11,72±1,20^{ef}
PBAE Roscovitine	76,09±1,79^{e}	2,32±0,33^{de}	17,93±1,29^{b}
PBAE Serum Açlığına Bırakma	86,61±2,92^{ab}	1,22±0,34^{e}	8,15±1,39^{g}
PBAE Kontakt İnhibisyon	87,33±1,78^{a}	1,58±0,25^{e}	7,54±1,02^{g}
Lipofectamine® Kontrol	75,76±1,64^{e}	5,06±0,80^{b}	15,11±1,06^{cd}
Lipofectamine® Trichostatin A	81,39±1,51^{d}	2,92±0,45^{d}	12,31±1,01^{ef}
Lipofectamine® Roscovitine	74,48±2,37^{e}	3,86±0,33^{c}	16,95±1,37^{bc}
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	85,18±3,01^{abc}	1,39±0,43^{e}	9,92±2,21^{fg}
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	81,68±4,59^{cd}	2,30±0,64^{de}	12,84±3,69^{de}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre sikluslarının dağılımlarına bakıldığında; PBAE Kontakt İnhibisyon, PBAE Serum Açlığına Bırakma ve Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma gruplarının G0/G1 fazı açısından en yüksek oranları verdiği (p≤0,01), PBAE Trichostatin A grubunun da bu grupları takip ettiği görüldü. S fazı ve G2/M oranlarına bakıldığında; bütün grupların en

yüksek oranları veren Kontrol grubundan istatistiksel anlamda düşük olduğu belirlendi($p \leq 0,01$; Tablo 4-21).

Tablo 4-22. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranları

GRUPLAR	Metillenme Oranları (%)
Kontrol	53,96±10,34[b]
PBAE Kontrol	38,00±16,43[ab]
PBAE Trichostatin A	16,79±7,16[a]
PBAE Roscovitine	41,22±17,63[ab]
PBAE Serum Açlığına Bırakma	44,43±12,04[ab]
PBAE Kontakt İnhibisyon	39,46±13,35[ab]
Lipofectamine® Kontrol	54,38±23,1b[b]
Lipofectamine® Trichostatin A	39,42±14,32[ab]
Lipofectamine® Roscovitine	57,96±23,50[b]
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	49,55±28,04[b]
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	37,32±3,97[ab]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranlarına bakıldığında; PBAE Trichostatin A grubunun en düşük metillenme oranlarını verdiği gözlendi ($p \leq 0,01$, Tablo 4-22).

PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik hücre dağılımlarına bakıldığında; canlı hücre oranlarında Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon, PBAE Kontakt İnhibisyon, Lipofectamine® Trichostatin A gruplarının en yüksek oranları verdiği ($p \leq 0,01$) ve bu grupları PBAE Trichostatin A gruplarının takip ettiği görüldü. Erken apoptozis oranlarına bakıldığında; serum açlığına bırakma gruplarının her iki transfeksiyon ajanı için de en yüksek oranları verdiği ($p \leq 0,01$), bu grupları iki transfeksiyon ajanının da Roscovitine gruplarının takip ettiği gözlendi. Geç apoptozis oranlarına bakıldığında; PBAE Serum Açlığına Bırakma grubunun en yüksek değerleri verdiği ($p \leq 0,01$) ve bunu Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma grubunun takip ettiği görüldü. Ölü hücre oranlarına bakıldığında ise; Kontrol grubunda yüksek değerler elde edildi (Tablo 4-23).

Tablo 4-23. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde apoptotik aktivite oranları

GRUPLAR	Hücrelerdeki Apoptotik Aktivite Oranları (%)			
	Canlı Hücre	Erken Apoptozis	Geç Apoptozis	Ölü Hücre
Kontrol	82,50±3,22^{e}	6,42±1,83^{bc}	2,07±0,52^{bc}	8,98±1,90^{a}
PBAE Kontrol	88,07±1,50^{cd}	5,78±1,63^{bcd}	1,40±0,94^{bcde}	4,73±1,80^{bc}
PBAE Trichostatin A	89,20±1,42^{bc}	4,19±1,70^{cde}	1,47±0,67^{bcde}	5,13±2,14^{bc}
PBAE Roscovitine	84,34±2,36^{de}	8,73±1,68^{b}	1,83±0,84^{bc}	5,09±2,26^{bc}
PBAE Serum Açlığına Bırakma	72,36±5,99^{g}	18,38±2,21^{a}	4,87±0,72^{a}	4,37±1,34^{bc}
PBAE Kontakt İnhibisyon	92,86±0,75^{ab}	2,94±1,14^{cde}	0,61±0,17^{de}	3,57±1,10^{bc}
Lipofectamine® Kontrol	90,21±2,61^{abc}	3,64±1,17^{cde}	1,43±0,51^{bcde}	4,71±0,69^{bc}
Lipofectamine® Trichostatin A	92,58±1,33^{ab}	1,33±1,02^{e}	0,89±0,29^{cde}	5,19±1,46^{bc}
Lipofectamine® Roscovitine	86,63±1,56^{cd}	5,33±0,83^{bcd}	1,78±0,49^{bcd}	6,25±2,19^{ab}
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	77,97±1,34^{f}	16,48±6,60^{a}	2,11±1,33^{b}	3,43±1,58^{bc}
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	94,20±1,27^{a}	2,44±0,44^{de}	0,57±0,19^{e}	2,78±0,30^{c}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklusların dağılımlarına bakıldığında; Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma grubunun G0/G1 fazı açısından en yüksek oranları verdiği ($p\leq0,01$) ve bu grubu Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon grubunun takip ettiği görüldü. S fazına bakıldığında; PBAE Serum Açlığına Bırakma grubunun ve G2/M oranlarına bakıldığında ise PBAE Roscovitine grubunun en yüksek oranları verdiği gözlendi ($p\leq0,01$; Tablo 4-24).

Tablo 4-24. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklusları dağılım oranları

GRUPLAR	Hücre Sikluslarına Göre Hücre Dağılım Oranları (%)		
	G0/G1 Fazı	S Fazı	G2/M Fazı
Kontrol	57,51±4,98^{d}	8,00±0,73^{b}	28,95±3,70^{cd}
PBAE Kontrol	55,17±5,04^{d}	4,90±0,46^{cde}	34,95±3,26^{b}
PBAE Trichostatin A	57,99±3,34^{d}	2,27±0,49^{fg}	35,06±2,71^{b}
PBAE Roscovitine	40,69±3,06^{e}	2,54±0,71^{efg}	50,03±1,78^{a}
PBAE Serum Açlığına Bırakma	37,23±3,46^{e}	12,23±3,47^{a}	25,19±6,60^{de}
PBAE Kontakt İnhibisyon	56,11±2,98^{d}	6,23±2,63^{bcd}	22,12±2,05^{e}
Lipofectamine® Kontrol	60,61±0,52^{cd}	7,30±0,31^{bc}	27,36±0,43^{cde}
Lipofectamine® Trichostatin A	66,38±1,97^{c}	4,39±0,45^{def}	24,94±1,03^{de}
Lipofectamine® Roscovitine	60,59±0,89^{cd}	4,36±0,30^{def}	31,00±0,71^{bc}
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	88,82±2,23^{a}	1,36±0,36^{g}	7,45±1,11^{g}
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	77,16±7,27^{b}	2,58±0,40^{efg}	14,79±4,37^{f}

^{abc} Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

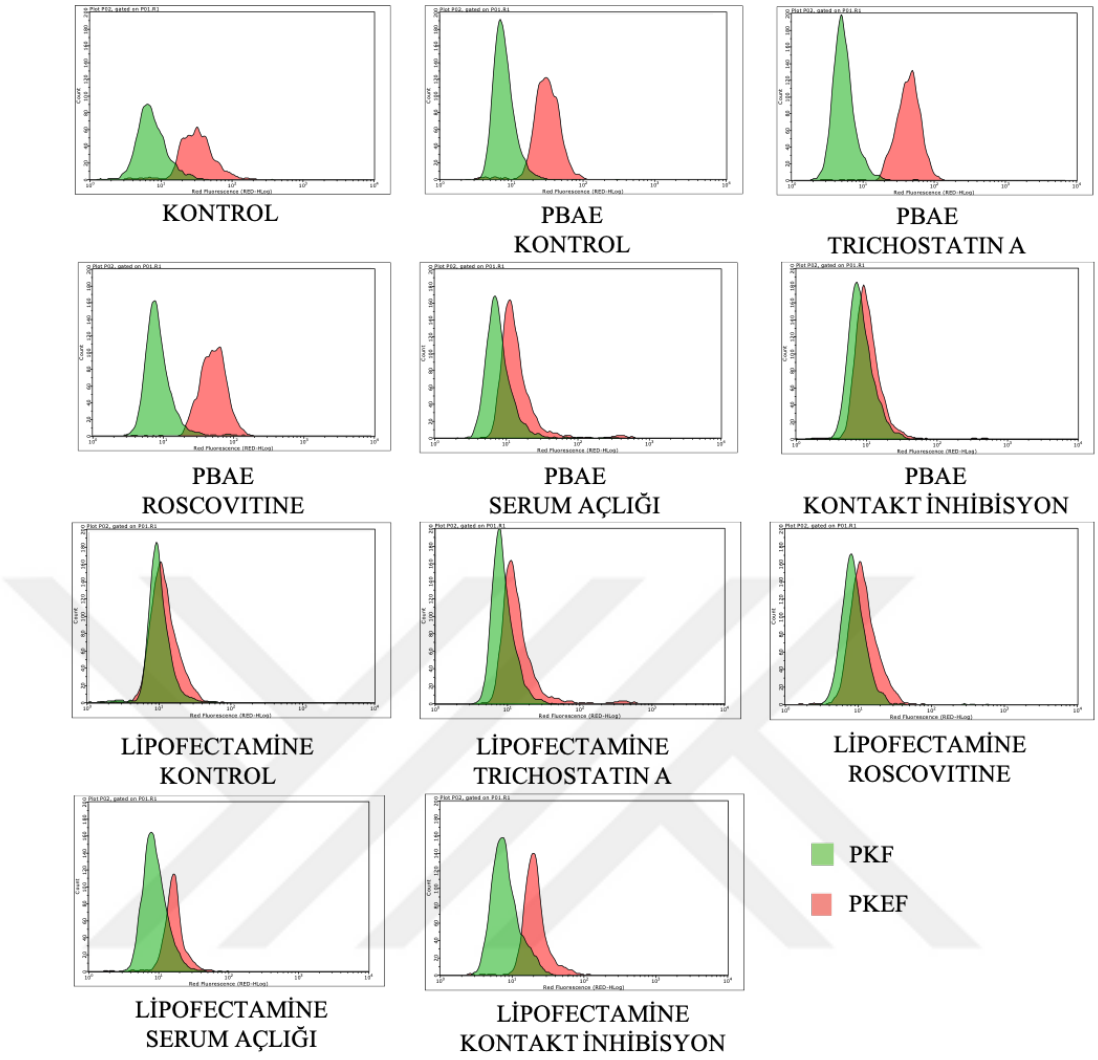
PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranlarına bakıldığında; en düşük metillenme oranını PBAE Kontakt İnhibisyon grubunun verdiği görülmektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-25).

Tablo 4-25. PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde metillenme oranları

GRUPLAR	Metillenme Oranı (%)
Kontrol	96,65±1,99[d]
PBAE Kontrol	97,62±0,98[d]
PBAE Trichostatin A	96,91±1,95[d]
PBAE Roscovitine	96,16±2,87[cd]
PBAE Serum Açlığına Bırakma	84,61±9,80[bcd]
PBAE Kontakt İnhibisyon	63,23±18,31[a]
Lipofectamine® Kontrol	76,31±15,56[ab]
Lipofectamine® Trichostatin A	82,07±8,19[bc]
Lipofectamine® Roscovitine	78,49±6,88[b]
Lipofectamine® Serum Açlığına Bırakma	95,50±2,54[cd]
Lipofectamine® Kontakt İnhibisyon	97,91±1,47[d]

[abc] Aynı sütunda farklı üst karakterle işaretlenmiş olan değerler arasındaki farklar önemlidir (P=0,00 Oneway ANOVA Tukey HSD)

PKF ve PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde DNA metilasyon analiz sonuçları Şekil 4-16'da akış sitometrisinde elde edilen histogram görüntüsü şeklinde karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Histogramlarda da görüldüğü gibi PKEF hücre hatlarındaki metilasyon seviyelerinin PKF hücrelerine göre kontrol grubu da dahil daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4-16. Transfekte PKF ve PKEF hücre hatlarının DNA metilasyon sonuçlarının karşılaştırmalı histogram grafikleri.

5. TARTIŞMA

Rekombinant DNA teknolojisi ile farklı kaynaklardan elde edilen genetik bilgiler birleştirilerek doğada daha önce var olmayan genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar elde edilebilmektedir. Bu teknoloji ilk olarak bakterilerde DNA segmentlerini klonlamak için kullanılırken, genetik mühendisliğin ilerlemesiyle birlikte rekombinant DNA molekülleri kullanılarak transgenik hayvan ve bitkilerin üretimine başlanmıştır (Sulabh ve Kumar, 2018).

Transgenik hayvanların üretimi başlıca insanların refahı ve sağlığı için kaynak sağlamaya yöneliktir. Üretilen transgenik hayvanlar belirli karakteristik özelliklerde olup sonunda insana yönelik ihtiyaçların karşılanması amacıyla üretilmektedir. Buna verilecek en iyi örneklerden biri; sütünde insan kaynaklı proteinleri içeren transgenik ineklerin üretilmesi ve bu proteinlerin sütten elde edilerek insan amfizemi gibi spesifik hastalıkların tedavisinde kullanılabilmesidir. Diğer bir örnek ise, Harvard bilim insanlarının önemli bir bilimsel ilerleme olarak ürettiği ve patentini aldığı OncoMouse® veya Harvard faresidir. Spesifik bir gen taşıyan bu fare, birçok insan kanser türünün gelişimini sağlayarak kanser tedavileri için önemli bir hastalık modeli oluşturmaktadır (Margawati, 2003).

Çiftlik hayvanlarında gen transferi uygulamalarına; ürün kalitesi ve miktarının geliştirilmesi, hastalık direnci oluşturulması, meme bezlerinde veya diğer organlarda değerli proteinlerin üretilmesi, ksenotransplantasyon amacıyla domuzların genetik olarak modifiye edilmesi ve yeni hayvan modellerinin geliştirilmesi örnek verilebilir. DNA mikroenjeksiyon yöntemi 1985 yılından beri birçok hayvan türünde başarıyla uygulanmasına rağmen, yöntemin etkinliği düşüktür. Yöntemin canlıda oluşturduğu etkiler arasında rastgele integrasyon oluşması ve bunun sonucunda mozaisizm, mutasyon ve değişken gen ifadelerinin şekillenmesi sayılabilir. Sperm aracılığıyla gen transferine bakıldığında, plazmidlerin spermatozoonlar ile bağlanması ve içselleşmesi anlaşılsa da yöntemin rutinde uygulanabilirliği düşüktür. Pluripotent kök hücrelerin çiftlik hayvanlarından eldesi ile ilgili çalışmalar yapılmasına rağmen memelilerde farelerdeki gibi başarıya ulaşılamamıştır. Yöntemlerin geneline bakıldığında koyun, sığır, keçi ve domuzlarda kültüre edilen hücrelerle yapılan nüklear transfer çalışmalarının çiftlik hayvanlarında uygulanan hedefli genetik modifikasyon çalışmalarında etkili olduğu görülmektedir (Wolf ve ark., 2000).

Kültüre edilen hücrelerle yapılan nüklear transfer çalışmaları iki önemli avantaj sağlamaktadır. Bunlardan ilki, sınırlı sayıda olan erken embriyo hücrelerinden fazla sayıda olma avantajı taşıması, ikinci olarak da kültüre edilen hücrelerin nüklear transfer öncesinde transfekte edilerek transgenik hayvan üretimine farklı bir yaklaşım sağlamasıdır. Bu stratejinin ilk örneği; insan faktör IX genini taşıyan transgenik koyunun transfekte fetal fibroblast hücreleri kullanılarak SCNT yöntemiyle elde edilmesidir (Schnieke ve ark., 1997). Bundan kısa bir süre sonra Cibelli ve ark. 1998 yılında ilk transgenik buzağıları elde etmişlerdir. Baguisi ve ark. ise 1999 yılında; transgenik olmayan bir dişi keçiye suni tohumlama ile transgenik bir tekenin spermasının verilmesi sonucunda elde edilen transgenik fetüsten kazanılan hücreler ile nüklear transfer yapılması sonrasında transgenik keçi üretmişlerdir.

Transgenezis amacıyla transfekte hücreler kullanılarak nüklear transfer yapılması, bu alanda en çok kullanılan yöntemlerden biri olan DNA mikroenjeksiyonu ile karşılaştırıldığında birçok açıdan ön plana çıkmaktadır. SCNT yöntemi, üretilmek istenilen transgenik hayvanların cinsiyetinin önceden belirlenebilmesine imkan tanımaktadır. Elde edilmek istenilen özelliğe göre erkek veya dişi hücre hatları seçilerek kullanılabilmektedir. Kültüre edilen hücrelere transfer edilmiş olan dizilerin integrasyon ve ifadeleri SCNT yönteminde donör olarak kullanımları öncesinde ortaya koyulabilmektedir. Bu analizler hayvanlar üretilmeden önce in vitro ortamda yapılabildiğinden maliyet ve iş gücünde azalmaya neden olmaktadır. Yine transfekte hücrelerin dondurularak saklanabilmesi de yöntemin en önemli avantajlarından biridir. Üretilen klon hayvanların bütün hücrelerinde ilgili genin bulunması ve böylece DNA mikroenjeksiyonunda karşılaşılan problemlerden biri olan mozaisizmin şekillenmemesi ve elde edilen hayvanların tamamının transgenik olması diğer önemli avantajlarından biridir. Stabil bir transfekte hücre hattından bir transgenik hayvan sürüsünün üretiminin daha kısa zamanda olabilmesi ve böylece kullanılan hayvan sayısı, maliyet ve zamandan tasarruf edilebilmesi transfekte hücreler ile nüklear transfer yöntemini diğer yöntemlere göre bir adım öne taşımaktadır (Schnieke ve ark., 1997; Wolf ve ark., 2000).

Transfeksiyon, genetik olarak modifiye edilmiş hücreler üretmek amacıyla yabancı nükleik asitlerin hücrelere verildiği bir teknolojidir. Bu genetik materyaller (DNA ve RNA'lar) hücre içerisinde genetik materyalin yapısına bağlı olarak kararlı veya geçici konumda bulunurlar. Kararlı transfeksiyonda, genetik materyal konak hücrenin

genomuna integre olan seleksiyon için bir işaretleyici gen barındırır ve konak hücrenin replikasyonu halinde bile transgenin ifadesi devam eder. Geçici transfeksiyonda ise, transfekte genler sadece kısa bir süre için ifade yaparlar ve bunlar genoma entegre olmadığından dolayı çevresel faktörlerin ve hücre bölünmelerinin etkisiyle kaybolabilmektedir. Memeli hücrelerinde transfeksiyon çalışmalarının asıl amaçları arasında gen ve gen ürünlerinin fonksiyonlarının incelenmesi, hücrelerde spesifik gen ifadelerinin geliştirilmesi veya engellenmesi, rekombinant proteinlerin üretilmesi sayılabilmektedir (Kim ve Eberwine, 2010).

Memeli hücrelerinde transfeksiyon amacıyla en çok kullanılan biyolojik yöntem viral vektörler aracılığıyla gen transferidir. Gen taşıma sistemlerinde kullanılan viral vektörler yüksek taşıma kapasiteleri olmalarına rağmen, canlıda immün ve yangısal cevaplar, toksisite problemleri, mutasyon gibi sorunları da beraberinde getirdiklerinden günümüzde viral olmayan taşıma sistemleri ön plana çıkmaya başlamıştır. Viral olmayan sistemlerin sağladığı; canlıda immünojenite oluşturmamaları, düşük maliyetleri, gelişmiş yükleme kapasiteleri ve yüksek kimyasal değişkenliğe sahip olmaları bu sistemlerin son yıllarda gen terapisinde tercih edilmesine neden olmuştur. Bunlara katyonik polimerler, katyonik lipitler ve inorganik nanopartiküller örnek verilebilir. Bunlardan katyonik polimerler kullanılan en eski metotlardan biriyken, katyonik lipitler ise alanda en popüler olandır. Bu sistemlerde genel prensip, elektrostatik interaksiyon ile pozitif yüklü kimyasalların negatif yüklü nükleik asitler ile polipleks yapı oluşturmaları ve 200 nm'den küçük bu yapıların hücrelere endositoz mekanizması ile giriş yapabilmeleridir (Chen ve ark., 2020).

Polimerik nanopartikül aracılığıyla gen transferi, insan fibroblast hücrelerinden pluripotent kök hücre üretilmesi amaçlı güvenilir ve etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu yeniden programlanan hücreler, yeni kök hücre hatların üretiminde kullanılarak in vitro hastalık modelleri oluşturma, ilaç denemeleri gibi alanlarda çalışma imkanı sunarak gen terapisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Yapılan literatür araştırmalarında PBAE'nin, insan fibroblast hücrelerinde gen transferi ile yeniden programlama amacıyla kullanıldığı görülmüştür (Bhise ve ark., 2013). PBAE nanopartikülünün gen transfer etkinliğini; Zhao ve ark. 2012 yılında lenfoma ve lösemi hücrelerinde, Kim ve ark. ise 2014 yılında insan göğüs kanseri hücrelerinde incelemiştir. PBAE'nin gen terapisine yönelik insan hücrelerinde kullanımı

ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Gök'ün 2012 yılında yapmış olduğu tez çalışmasında ise PBAE ilk defa koyun primer fibroblast hücrelerinde denenmiş ve transfeksiyon etkinlikleri ile sitotoksik özellikleri incelenmiştir. Koyun primer fibroblast hücrelerinde transfeksiyon etkinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir.

Kitosan, sitotoksik olmayan ve yüksek transfeksiyon etkinliği olduğu bilinen doğal bir polimerdir (Ishii ve ark., 2001). Turan ve Akbuğa'nın (2010) çalışmasında, kitosanın gen transferinde in vitro etkinliği primer insan ve fare fibroblast hücrelerinde çalışılmıştır. Gök ve ark.'nın 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada, modifiye kitosan nanopartikülünün primer koyun fibroblastlarında transfeksiyon etkinliği ve sitotoksisitesi ilk defa çalışılmış ve transfeksiyon etkinliğini %20 olarak açıklamışlardır.

Ladewig ve ark. (2010) LDH nanopartikülünün yapısı ve gen transferinde kullanımı ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Senapati ve ark. (2019) GFP protein kodlu plazmidin HeLa hücrelerinde LDH ile transfeksiyonu ve ifadesini göstermiş ve bu nanopartikülün kanser tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir viral olmayan vektör olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Ticari bir kimyasal transfeksiyon ajanı olan Lipofectamine® 2000, katyonik lipid yapıda bir polimerdir ve in vivo ve in vitro gen transferi için kullanılan en etkili yöntemlerden biridir. Bu polimerin genetik materyaller ile oluşturduğu komplekslerin birçok hücre tipi ve dokuda gen taşınmasında başarılı olduğu bilinmektedir. Özellikle in vivo çalışmalarda akciğer, endotelyum, kas gibi farklı dokularda ve ilaç ve aşı taşınmasında başarıyla kullanılmaktadır (Recillas-Targa, 2006). Fakat bazı hücre tiplerinde, özellikle insan kaynaklı primer hücrelerde düşük transfeksiyon etkinliği ve yüksek sitotoksisite gösterdiği bilinmektedir (Gheisari ve ark., 2008). In vitro ortamda yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu durumlarda da, in vivo ortamda sitotoksisite dolayısıyla kullanımı sınırlıdır (Ishii ve ark., 2001).

Sunulan bu çalışmada; yapılan literatür araştırmaları ışığında primer koyun fibroblast hücrelerinde PBAE, kitosan, LDH ve Lipofectamine® viral olmayan gen taşıyıcı vektörlerinin karşılaştırmalı olarak transfeksiyon etkinlikleri ilk defa incelenmiştir. Polimerlerin karşılaştırmalı transfeksiyon etkinlikleri, apoptotik aktivite oranları ve membran bütünlüğü oranları incelendiğinde; PBAE'nin uygulama şeklinin tekrar modifiye edilmesi de göz önünde tutulduğunda en iyi transfeksiyon etkinliğini (%80,8) iki hücre hattında da PBAE'nin vermiş olduğu görülmektedir ($p<0,05$; Tablo 4-

1, Tablo 4-4, Şekil 4-9). Kitosan ve LDH'in PKF hücrelerinde sırasıyla %3,63 ve %1,69 oranları ve PKEF hücrelerinde sırasıyla %3,15 ve %1,65 oranları ile transfeksiyon oluşturmada başarısız oldukları görülmüştür. Apoptotik aktivite oranları değerlendirildiğinde, Lipofectamine®'in PKF hücrelerinde %22,70 ve PKEF hücrelerinde % 29,28 oranları ile iki hücre tipinde de en yüksek erken apoptoz oranlarını verdiği dikkat çekmektedir ($p<0,05$; Tablo 4-2 ve Tablo 4-5). Yine membran bütünlüğü sonuçlarına bakıldığında, Lipofectamine®'in transfeksiyon sonrası canlı fakat hasarlı membran oranlarının PKF hücrelerinde %23,40 ve PKEF hücrelerinde %22,03 oranları ile en yüksek olduğu gözlenmektedir ($p<0,05$; Tablo 4-3 ve Tablo 4-6). Özellikle SCNT'ye yönelik transgenik hücre eldesinde, apoptoz başarıyı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Transfeksiyon etkinliği yüksek olan PBAE polimerinin hücrelerde oluşturduğu apoptoz değerlerinin düşük olması ($p<0,05$) ve membranı sağlam canlı hücre oranının yüksek olması ($p<0,05$), bu polimerin bu amaçla kullanılmasına büyük bir avantaj sağlamaktadır. Kitosan polimeri ve LDH sentetik kili, kaynak gösterilen diğer birçok hücre tipinde transfeksiyon etkinliği başarısı göstermesine rağmen, PKF ve PKEF hücrelerinde başarı sağlanamamıştır. Bu hücrelerde bu iki gen taşıyıcı sistemin geliştirilmesine yönelik çalışmaların yapılması gerektiği görülmüştür. Özellikle LDH sentetik kilinin apoptotik aktivite oranları ve membran bütünlüğü oranlarında Kontrol grubuna benzer sonuçlar vermesi, bu taşıyıcı sistemin de geliştirildiği takdirde SCNT'ye yönelik transgenik hücre eldesinde kullanılabileceğinin önemli bir göstergesidir.

İlk insan olmayan primat türü makak maymununun 2018 yılında SCNT yöntemi ile başarıyla klonlanması, biyoteknoloji dünyasının dikkatinin tekrar SCNT teknolojisine yönelmesine neden olmuştur (Liu ve ark., 2018b). SCNT teknolojisinin 1997 yılında klon koyun Dolly ile başlayan macerasından 20 yıl sonra bugüne bakıldığında gelinen nokta başarıyı göstermektedir. Bu başarının sağlanması tartışmasız olarak SCNT yönteminde epigenetik bariyerlerin anlaşılması ve yeniden programlamanın etkin olarak uygulanmasına bağlıdır.

SCNT teknolojisi ile hayvancılık alanında; nesli tehlikede olan türlerin kurtarılması (Gomez ve ark., 2009; Keefer, 2015), ticari anlamda önem taşıyan türlerin genetik kaynaklarının korunması, çiftlik hayvanlarında üretimin hızlanması gibi ilerlemelerin yanı sıra genom modifikasyonu teknolojisi ile beraber hızlı büyüme, hastalık direnci, iyi et kalitesi, kısa üreme siklusu gibi özelliklere sahip çiftlik

hayvanlarının da üretilebilmesi büyük bir teknolojik ilerlemedir (Galli ve ark., 2012; Wells and Prather, 2017; Lee ve ark., 2020). İlaç endüstrisinde; meme bezlerinin biyoreaktör olarak kullanılmasıyla terapötik proteinlerin üretilebilmesi, insan hastalıklarının patogenezinin anlaşılabilmesi için hayvan hastalık modellerinin oluşturulabilmesi, transplantasyon hastalarına genetik olarak modifiye edilmiş ksenograft organların üretilebilmesi, embriyonik kök hücre tedavilerinin organ yenilenmesinde kullanılabilmesi de SCNT teknolojisinin sağladığı ilerlemeler arasındadır (Lotti ve ark., 2017; Niu ve ark., 2017; Telugu ve ark., 2017; Tachibana ve ark., 2013).

SCNT teknolojisi ile günümüzde birçok alanda ilerleme sağlanabilmesine rağmen, canlı elde edilen klon hayvanların yüzdesi halen düşük olduğundan teknolojinin etkin olarak uygulanabilirliği kısıtlanmaktadır. Klonlama etkinliğini ve canlı klon hayvan sayısını artırabilmek adına araştırıcılar; donör hücre tipi, oosit maturasyon aşaması, embriyo aktivasyon protokolleri gibi klon embriyoların gelişimsel yeterliliğini incelemenin yanı sıra, özellikle SCNT kaynaklı nüklear yeniden programlama üzerine yoğunlaşarak yöntemin başarısını arttırma yolunda çalışmalar yapmaktadır (Czernik ve ark., 2019; Matoba ve Zhang, 2018b).

Son yıllarda SCNT yönteminde teknolojik ilerlemeler yaşanmasına ve bu ilerlemelerin bilimsel ve medikal anlamda önemli bir yer edinmesine rağmen; nüklear yeniden programlama mekanizmasının moleküler aşamaları tamamen anlaşılmış değildir. Bu sebeple yöntemin avantajları ile tercih sebebi olmasına rağmen etkinliği halen istenilen düzeyde değildir. Yöntemin etkinliği değerlendirildiğinde; transfer edilen embriyo sayısının elde edilen canlı yavru sayısına oranlanmasıyla tüm hayvanlarda oran %2-3 civarındadır. Fakat bu oran sığırda %5-20 civarına yükselmektedir. Sığırda SCNT yönteminin başarısının bu oranda yüksek olmasının en önemli sebebi bu türe özgü olan geç embriyonik genom aktivasyonudur. Ayrıca sığırcılık endüstrisinin gelişimine bağlı olarak in vitro embriyo üretimi ve embriyo transferi gibi reprodüktif teknolojilerin optimize edilmiş olması da yöntemin başarısını etkileyen diğer bir önemli faktördür (Rodriguez-Osorio ve ark., 2012).

SCNT ile yapılan çalışmalarda karşılaşılan düşük klonlama etkinliği, anormal embriyo fenotipleri, düşük canlılık oranları gibi problemler çoğunlukla donör nükleusun eksik programlanmasına bağlanmaktadır (Wang ve ark., 2020). SCNT yönteminin başarısının artırılması için birçok strateji üzerinde durulmuştur. Bunlardan çoğunluğu

donör hücrenin hücre tipi veya elde edildiği dokunun kaynağı, pasaj sayısı, hücre siklus aşaması veya donör hücrenin epigenetik durumunun modifiye edilmesi için kimyasal ajanların ve hücresel ekstraktların kullanılması üzerinedir (Rodriguez-Osorio ve ark., 2012).

Hücresel yeniden programlama ile somatik hücre genomunun epigenetik hafızasının silinebilmesinden dolayı, bu durum SCNT teknolojisinin başarısı için önemli bir faktör olarak kabul edilmektedir. Yeniden programlama amacıyla farklı stratejiler geliştirilmiş olmakla beraber, yapılan çalışmalar çoğunlukla hücre siklusunun G0 veya G1 fazında duraklatılması üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yeniden yapılandırılan embriyoların sağlıklı normal gelişimlerine devam edebilmeleri için donör nükleusun ve alıcı sitoplastın hücre siklusu koordinasyonunun sağlanması gerektiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Campbell ve ark., 1993, 1994). Bu çalışmalarda, yetişkin, embriyonik ve fötal koyun hücre hatlarından canlı yavru eldesinin, nüklear transfer öncesinde hücrelerin G0/G1 fazında olmasıyla mümkün olduğu da belirtilmiştir. Alıcı sitoplazmasının MII aşamasında hazır olması ve programlanmış donör nükleusun transfer edilmesi ile kromozomal hasarın önlenmesi ve normal ploitliğin sağlanabildiği bilinmektedir. Aktivasyon sırasında konak sitoplast MPF aktivitesi yüksek iken, transfer edilen bütün somatik hücre nükleusları nüklear zarf yıkımlanması geçirmekte ve bunu prematür kromozom kondensasyonu takip etmektedir. Daha sonra nüklear zarf yeniden şekillenir ve DNA sentezi gerçekleşir. Fakat transfer sırasında nükleus diploid, yani G0/G1 fazında değil ise, önceden replikasyon olmuş olan DNA tekrar replike olur ve ilk hücre siklusu sonunda, DNA miktarı kardeş hücrelerde hatalı hale gelir ve poliploidi görülür. Somatik hücre nükleusunun farklı siklus aşamalarında yapılan çalışmalarda yavru elde edilmiş olmasına rağmen, hücre siklusu sonunda artmış olan DNA miktarının düzensiz ayrılmalara ve kromozomal anormalliklere de sebep olduğu bilinmektedir (Campbell ve ark., 2003).

G0 donör hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda koyunlarda (Campbell ve ark., 1996; Wilmut ve ark., 1997), sığırlarda (Kato ve ark., 1998; Wells ve ark., 1999), farelerde (Wakayama ve ark., 1998) ve kedilerde (Shin ve ark., 2002) canlı yavru elde edilmiştir. Wells ve ark.'nın 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada özellikle primer hücre kültürü kullanıldığında G0 donörlerin embriyo gelişimi açısından daha başarılı olduğunu göstermişlerdir.

Campbell ve ark. 1996 yılında yaptıkları çalışmada, ilk defa koyun embriyolarından elde ettikleri epitelyal hücre hatlarını serum açlığına bırakma yöntemi ile programlayarak nüklear transfer yöntemiyle yavru eldesinde kullanmışlardır.

Wilmut ve arkadaşlarının 1997 yılında Dolly'i elde ederken serum açlığına bırakma yöntemini kullanması da, SCNT başarısı için hücre siklusunun programlanmasının önemini ön plana çıkarmıştır. Çalışmada yetişkin meme bezi, fetüs ve embriyodan elde edilen hücre hatları serum açlığına bırakma yöntemi kullanılarak programlanmıştır. Bu çalışma sayesinde, yetişkin bir hücreden yavru elde edilebilmesi ile sağlıklı yavru gelişiminin olabilmesi için hücre hatlarının farklılaşması sırasında genetik materyalde geri dönüşümsüz modifikasyonlara gerek olmadığını ortaya koymuştur.

Gibbons ve ark.'nın 2002 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, yetişkin sığır granulosa hücrelerinde bir siklin bağımlı kinaz (CDK) 2 inhibitörü olan Roscovitine serum açlığına bırakma yöntemi ile karşılaştırmalı olarak çalışılmış ve bu hücreler ile nüklear transfer yapılarak canlı yavru elde edilmiştir. Roscovitine grubunda, %82,4 oranında G0/G1 fazı hücre elde edilerek serum açlığına bırakma grubuna göre (%76,7) daha iyi sonuç elde edilmiştir. Yine çalışmada elde edilen sonuçlara göre, canlı yavru elde etme yüzdesinin Roscovitine grubunda (%11,3) serum açlığına bırakma grubuna (%3,3) göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Cho ve ark. (2005) fötal sığır fibroblast hücrelerinde kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma ve Roscovitine uygulamalarının hücre siklusu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yapılan hücre siklus analizlerinde, kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma ve Roscovitine gruplarının G0/G1 fazında hücre oranları sırasıyla %86,9, %82,9 ve %82,8 olarak bulunmuş ve istatistik anlamda bir fark olmadığı görülmüştür. Apoptoz ve canlılık analizlerinde ise, serum açlığına bırakma yönteminde %10,4 oranı ile apoptotik hücre oranının diğer gruplara göre fazla olduğu ve istatistik anlamda fark olduğu görülmüştür (kontakt inhibisyon %5,7 ve Roscovitine %6,0).

Oh ve ark. (2009) köpek fibroblast hücrelerinde kontakt inhibisyon ve Roscovitine uygulamalarını karşılaştırmış, hücre siklus ve apoptoz analizleri yapmıştır. Hücre siklusu ve apoptoz analizleri açısından gruplar arasında istatistiksel anlamda önemli fark görülmemiştir. Fakat gruplar ile yapılan nüklear transfer sonrasında elde edilen gebelik ve yavru oranlarına bakıldığında, Roscovitine grubundaki hücrelerle yapılan transferlerin klonlama etkinliğini artırdığı görülmüştür.

Park ve ark. 2010 yılında domuz fötal fibroblastlarında kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma ve Roscovitine uygulamalarını karşılaştırmış, hücre siklus ve apoptoz analizleri ile değerlendirmişlerdir. Hücre siklus analizlerinde serum açlığına bırakma grubunun G0/G1 fazında %87,5 ile en yüksek sonucu verdiği, kontakt inhibisyon ve Roscovitine grupları arasında fark olmadığı görülmüştür. Apoptoz analizlerine bakıldığında ise Roscovitine grubunun istatistiksel olarak %3,7 oranı ile en düşük sonucu verdiği, serum açlığına bırakma grubunun ise %13,9 ile en yüksek sonucu verdiği görülmüştür.

Kumar ve ark. (2017) yetişkin keçi fibroblast hücrelerinde serum açlığına bırakma, kontakt inhibisyon, Roscovitine ve aphidicolin grupları denemiş ve daha sonra bu hücrelerde Oct-4 ve Nanog gibi pluripotent genlerin ifadelerini incelemiştir. Çalışma sonucunda; normal hücrelerde saptanamayan pluripotensi göstergesi olan Oct-4 ve Nanog gen ifadelerine bakıldığında; Roscovitine, kontakt inhibisyon ve Aphicolin grubunda serum açlığına bırakma grubuna göre Oct-4 değerinin daha yüksek olduğu ve Nanog değerinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Transgenik hücrelerde Roscovitine uygulamasına yönelik literatür araştırması yapıldığında, Sun ve arkadaşlarının 2008 yılında transgenik klon sığırın kulağından elde edilen fibroblastlarda kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma ve Roscovitine uygulamalarını denedikleri ve blastosist gelişimlerini değerlendirilmiştir. Hücre siklus analizlerine bakıldığında, kontakt inhibisyon, serum açlığına bırakma ve Roscovitine gruplarının G0/G1 fazı oranları sırasıyla %91,0, %91,1 ve %89,7 olarak bulunmuştur.

Eren ve ark. (2014) koyun ve keçi fibroblast hücrelerinde Roscovitine, kontakt inhibisyon ve serum açlığı uygulamalarını denemiş, hücre siklus ve apoptoz sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Koyun fibroblastlarında Roscovitine uygulaması sonrasında G0/G1 oranlarının 30 µM için %51,33 ve 15 µM için %66,64 ile diğer gruplardan düşük olduğu görülmüştür. Apoptoz analizleri açısından koyun hücrelerinde gruplar arasında fark görülmemiştir.

Sunulan bu çalışmada; koyun fötal (PKEF) ve erişkin (PKF) primer hücre hatları 10, 15, 20 ve 30 µM Roscovitine inhibitörü ve 25, 50, 75 ve 100 nM Trichostatin A inhibitörü ile 24 saat muamele edilerek tekrarlı uygulamalarla denenmiş ve bu hücrelerde hücre siklus dağılımları ve apoptotik aktivite oranlarına akış sitometrisi ile bakılmıştır. PKEF hücrelerinde Roscovitine uygulamasından sonra G0/G1 oranlarına bakıldığında;

15 ve 20 µM dozlarının sırasıyla %48,55 ve %49,96 ile en yüksek oranları verdiği (Tablo 4-7, $p<0,05$), apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında ise 10, 15 ve 20 µM dozlarının en yüksek canlılık oranlarını (sırasıyla %90,84, %92,64 ve %90,58) verdiği, 30 µM dozunda ise canlılık oranının önemli derecede %79,87'ye azaldığı ve erken ve geç apoptozis oranlarının bu dozda yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla %4,62 ve %7,62, Tablo 4-8; $p<0,05$). PKF hücrelerinde G0/G1 oranlarına bakıldığında ise dozlar arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür (sırasıyla %57,32, %58,41, %57,00 ve %55,26, Tablo 4-9). S fazı açısından en yüksek değeri 10 µM, G2/M fazı açısından ise 20 µM deneme grubu vermiştir (Tablo 4-9). Apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında da gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı ($p>0,05$), fakat oransal olarak bakıldığında canlı hücre oranlarında 15, 20 ve 30 µM dozlarının (sırasıyla %88,97, %87,95 ve %85,86), 10 µM dozuna göre (%75,73) daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir (Tablo 4-10). Hücre siklus senkronizasyon ve hücrelerdeki apoptotik aktivite sonuçlarının topluca değerlendirilmesi sonucunda, PKF ve PKEF hücrelerinde roscovitine inhibitörünün 15 µM dozunun daha iyi sonuç verdiği ve çalışmalara bu doz ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çalışmada, PKF ve PKEF hücrelerinde Trichostatin A inhibitörünün 25, 50, 75 ve 100 nM dozları Roscovitine gruplarında olduğu gibi 24 saat uygulanmış, süre sonunda bu hücrelerde hücre siklus dağılımları ve apoptotik aktivite oranları incelenmiştir. PKEF hücrelerinde G0/G1 oranlarına bakıldığında; 50, 75 ve 100 nM oranları sırasıyla %70,53, %69,77 ve %70,05 sonuçlarını vermiş ve 25 nM oranı (%56,53) ile aralarında anlamlı fark görülmüştür ($p<0,05$; Tablo 4-11). Aynı hücre hattında apoptotik hücre dağılımlarına bakıldığında ise; en iyi canlı hücre oranını 50 nM konsantrasyonunun verdiği, erken apoptozis, geç apoptozis ve ölü hücre oranlarında 75 ve 100 nM oranlarının bu değerlere benzer sonuçlar verdiği, 25 nM konsantrasyon kullanıldığında ise canlı hücre oranı ve ölü hücre oranları açısından 50 nM konsantrasyonuna göre önemli derecede düşük sonuçların alındığı ($p<0,05$) canlı hücre, erken apoptozis, geç apoptozis ve ölü hücre oranları açısından 75 ve 100 nM konsantrasyonlarıyla benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür ($p>0,05$; Tablo 4-12).

Hücre siklusu ve apoptotik değişiklikler açısından veriler topluca değerlendirildiğinde PKEF hücre hattı için Trichostatin A ile yapılacak hücre siklusu çalışmasında en iyi sonuçların 50 nM konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür (Tablo 4-11 ve Tablo 4-12). PKF hücre hattında ise G0/G1 oranlarına bakıldığında; 50,

75 ve 100 nM oranları sırasıyla %65,86, %66,09 ve %67,46 sonuçlarını vermiştir. Bu konsantrasyonlarda elde edilen G0/G1 oranları ile 25 nM oranında elde edilen sonuçlar (%61,52) arasında anlamlı farkların olduğu görülmüştür ($p<0,05$; Tablo 4-13). Aynı hücre hattında apoptotik hücre dağılımlarına bakıldığında ise; canlı hücre, erken apoptozis ve ölü hücre oranlarında dozlar arasında fark olmadığı, fakat yüzdesel oranlar açısından değerlendirildiğinde, 50 nM oranının en iyi sonuçları verdiği görülmektedir (Tablo 4-13 ve Tablo 4-14). Farklı Trichostatin A konsantrasyonlarının kullanıldığı deneme gruplarında elde edilen hem hücre siklusu senkronizasyon sonuçları hem de hücrelerde gözlemlenen apoptotik değişiklik sonuçlarının topluca genel değerlendirilmesi sonucunda, PKF ve PKEF hücrelerinde Trichostatin A inhibitörünün 50 nM dozunun daha iyi sonuç vereceği görülmüştür.

Çalışmanın devamında, PKF ve PKEF hücrelerinde Roscovitine inhibitörünün 15 µM dozu ve Trichostatin A inhibitörünün 50 nM dozu, kontakt inhibisyon ve serum açlığına bırakma gruplarıyla karşılaştırılmış, hücre siklus dağılımları ve apoptotik aktivite oranları değerlendirilmiştir. PKEF hücrelerinde hücre siklus dağılımlarına bakıldığında; G0/G1 fazında serum açlığına bırakma grubu %83,71 oranı ile en yüksek sonucu vermiş, onu %70,53 ve %68,78 oranları ile Trichostatin A ve kontakt inhibisyon grupları takip etmiştir ($p<0,05$; Tablo 4-15). Apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında ise canlı hücre oranları arasında önemli bir fark görülmemiştir (Tablo 4-16; $p>0,05$). Roscovitine grubu G0/G1 fazında %48,55 ile en düşük sonucu vermiş olmasına rağmen, apoptotik aktivitesinin düşük olması dikkat çekmiştir. Ancak hücre senkronizasyon oranlarının diğer deneme gruplarının çok altında kaldığı dolayısı ile hücre siklusu senkronizasyonda başarısız olduğu görülmüştür.

PKF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyon sonuçlarına bakıldığında; G0/G1 fazında serum açlığına bırakma grubu %71,09 ile en yüksek sonucu vermiş olup, onu sırasıyla Trichostatin A (%65,86), kontakt inhibisyon (%61,74) ve Roscovitine (%58,41) grupları takip etmektedir ($p<0,05$; Tablo 4-17). Apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında; canlı hücre, erken apoptozis ve ölü hücre oranları arasında benzerlik görülürken, geç apoptozis oranlarında serum açlığına bırakma grubu en yüksek sonucu (%7,69) vermiştir ($p<0,05$; Tablo 4-18). Yapılan literatür araştırmalarında, Trichostatin A'ya göre kontakt inhibisyon veya serum açlığına bırakmanın senkronizasyon açısından daha iyi sonuç vermesine rağmen, Trichostatin A'nın klonlama başarısının yüksek olması

da önemli bir faktördür. Bu durum sadece tek bir değerlendirmenin yeterli olmadığını göstermektedir. Planlanan çalışmada birden fazla etki mekanizması olduğu göz önünde bulundurulması gerektiği fikri ortaya çıkmıştır.

Literatür kaynaklarda araştırmacıların sığırlarda Roscovitine uygulaması ile yapılan çalışmalarda G0/G1 oranlarında %80 civarında sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen (Gibbons ve ark., 2002; Cho ve ark., 2005; Sun ve ark., 2008), sunulan bu çalışmada koyun hücrelerinin senkronizasyon çalışmalarında aynı başarıyı vermediği gözlenmiştir. Bu sonuç Eren ve ark. (2014) yaptıkları çalışmadaki sonuçları ile benzerlik gösterdiği ve elde ettikleri veriyi desteklediği görülmüştür. Roscovitine inhibitörünün G0/G1 fazındaki hücre oranları açısından başarısız olmasına rağmen, hücre canlılığı açısından iyi sonuç vermesi önemli olarak değerlendirilebilir.

Bir histon deasetilaz inhibitörü olan Trichostatin A Streptomyces hygroscopicus'dan izole edilen doğal bir üründür ve embriyonik kök hücrelerde asetillenmiş histon havuzunu artırmak ve belirli genlerin ileri düzeyde ifadesini sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır. Histon deasetilaz inhibitörleri somatik hücrelerin yeniden programlama kapasitelerini geliştirerek klonlama etkinliğini artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Trichostatin A ile farelerde (Kishigami ve ark., 2006, 2007), domuzlarda (Zhao ve ark., 2010) ve sığırlarda (Akagi ve ark., 2011) yapılan çalışmalarda, SCNT ile üretilen embriyoların genomik programlanmalarını olumlu yönde etkilediği ve implantasyon öncesi gelişimlerini geliştirdiği görülmüştür.

Wee ve ark. 2007 yılında sığır fibroblastlarında Trichostatin A uygulaması yapmış ve bu hücrelerde DNA metilasyon seviyelerine bakmışlardır. DNA metilasyon seviyelerini normal fibroblastlarda %67,2 seviyesinde, Trichostatin A uygulanmış olan fibroblastlarda %42,2 seviyesinde bulmuşlardır.

Yao ve ark. 2012 yılında koyun fibroblast ve koyun kumulus hücrelerinde Trichostatin A uygulayarak nüklear transfer yaptıkları embriyolarda asetilasyon seviyelerine bakmışlardır. Trichostatin A ile muamele edilen fibroblast ve kumulus hücrelerinin transferi ile elde edilen aktivasyon yapılmayan oositlerdeki asetilasyon seviyelerine baktıklarında önemli düzeyde yüksek asetilasyon tespit etmişlerdir. Normal olarak üretilmiş klon embriyolarda yapılan karşılaştırmalarda ise, Trichostatin A ile muamele edilen fibroblastlarla üretilmiş embriyolardaki asetilasyon seviyelerinin IVF ile elde edilen embriyolara benzer olduğunu, Trichostatin A ile muamele edilen kumulus

hücreleri ile üretilmiş embriyolarda Trichostatin A ile muamele edilen fibroblastlara göre daha yüksek asetilasyon seviyesi gözükmesine rağmen düşük embriyo gelişimi gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Beaujean ve ark.'nın 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada serum açlığına bırakılmış sığır fibroblast hücrelerinde DNA metilasyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Yao ve ark. 2009 yılında sığır kumulus hücrelerinde Trichostatin A, Roscovitine, serum açlığına bırakma ve kontakt inhibisyon uygulamaları denemiş ve hücre siklusu ve asetilasyon seviyelerini incelemişlerdir. Trichostatin A uygulanan hücrelerde diğer gruplara kıyasla daha yüksek asetilasyon seviyesi ve daha iyi morfoloji görmüşlerdir.

Wu ve ark. 2008 yılında transgenik sığır fibroblast hücrelerinde Trichostatin A'yı farklı dozlarda uygulamış ve DNA metilasyon ve asetilasyon seviyelerine bakmışlardır. Trichostatin A'nın 10-50 ng/mL uygulandığı hücrelerde DNA metilasyon seviyelerinde azalma ve asetilasyon seviyelerinde artış gözlenmiştir.

Xiangchen ve ark. 2011 yılında koyun erişkin fibroblast ve kumulus hücrelerinde Trichostatin A uygulamış ve hücre siklus dağılımları ile histon asetilasyon ve DNA metilasyon değerlerine bakmışlardır. Koyun fibroblast hücrelerinde G0/G1 fazında Trichostatin A uygulaması %82,03 oranını verirken, histon asetilasyonunda artış ve DNA metilasyonunda da azalışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada, hücre senkronizasyon gruplarının normal PKF ve PKEF hücrelerinde uygulanması sonrasında, önceden PBAE ve Lipofectamine® transfeksiyon ajanları ile transfekte edilip, seleksiyon işlemi sonrasında üretilmiş olan transfekte PKF ve PKEF hücrelerinde hücre siklus senkronizasyonu, apoptotik aktivite ve DNA metilasyon oranları değerlendirilerek karşılaştırılmıştır. PKF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklus senkronizasyon sonuçlarına bakıldığında; PBAE kontakt inhibisyon (%87,33), PBAE serum açlığına bırakma (%86,61) ve Lipofectamine® serum açlığına bırakma (%85,18) gruplarının en yüksek G0/G1 fazı oranlarını verdiği, bu grupları PBAE Trichostatin A (%83,49), Lipofectamine® kontakt inhibisyon (%81,68) ve Lipofectamine® Trichostatin A (%81,39) gruplarının takip ettiği görülmüştür ($p \leq 0,01$; Tablo 4-21). Transfeksiyon yöntemi ile senkronizasyon yönteminin birbirlerini etkilediği ve bu etkinin sonuçlara yansıdığı söylenebilir. Transfeksiyon sonrası hücrelerdeki senkronizasyonların G0/G1

oranları açısından transfekte olmayan hücrelere göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Grupların apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında; Lipofectamine® Trichostatin A (%84,17) ve PBAE kontakt inhibisyon (%83,73) grupları canlı hücre oranlarında en yüksek sonuçları vermiş olduğu, Lipofectamine® kontakt inhibisyon, Lipofectamine® Roscovitine ve PBAE Trichostatin A gruplarının da sırasıyla %83,57, %80,45 ve %76,96 oranları ile yüksek değerler gösterdiği gözlenmiştir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-20). Erken apoptozis oranlarına bakıldığında; PBAE serum açlığına bırakma ve Lipofectamine® serum açlığına bırakma gruplarının sırasıyla %7,90 ve %12,95 oranları ile en yüksek değerleri verdiği dikkat çekmektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-20).

Bu hücrelerde yapılan DNA metilasyon analizlerinde; %16,79 oranı ile PBAE Trichostatin A grubunun en düşük oranı verdiği görülmektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-22). Diğer gruplarda kontrol grubu ile aralarında istatistiksel anlamda fark olmamasına rağmen, yüzdesel oranlara bakıldığında Lipofectamine® kontakt inhibisyon (%37,32), Lipofectamine® Trichostatin A (%39,42) ve PBAE kontakt inhibisyon (%39,46) oranları ile kontrol grubuna göre (%53,96) metillenme oranlarını düşürdükleri gözlenmiştir (Tablo 4-22).

PKEF hücrelerinde transfeksiyon sonrası yeniden programlanan hücrelerde hücre siklus dağılımlarına bakıldığında ise; hücre siklus dağılımlarına göre Lipofectamine® serum açlığına bırakma grubunun %88,82 oranı ile en başarılı G0/G1 oranını verdiği görülmüştür ($p \leq 0,01$; Tablo 4-24). Bu sonucu %77,16 oranı ile Lipofectamine® kontakt inhibisyon grubu takip etmiştir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-24). Genel olarak tüm gruplara bakıldığında, bu iki grup dışında kalan diğer grupların düşük G0/G1 oranları verdiği ve programlamada başarısız oldukları gözlenmiştir (Tablo 4-24). Apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında; Lipofectamine® kontakt inhibisyon, PBAE kontakt inhibisyon, Lipofectamine® Trichostatin A ve PBAE Trichostatin A gruplarının sırasıyla %94,20, %92,86, %92,58 ve %89,20 oranları ile yüksek canlı hücre değerleri verdiği görülmüştür ($p \leq 0,01$; Tablo 4-23). Bu değerleri Lipofectamine® Roscovitine (%86,63) ve PBAE Roscovitine (%84,34) grupları izlemektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-23). Erken apoptozis oranlarında, PBAE serum açlığına bırakma ve Lipofectamine® serum açlığına bırakma grupları sırasıyla %18,38 ve %16,48 oranlarıyla diğer gruplara göre en yüksek oranları vermiştir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-23).

PKEF hücrelerinde yapılan DNA metilasyon analizlerinde; kontrol grubundaki metillenme oranlarının PKF hücrelerine göre çok yüksek olduğu görülmüştür (%96,65). PBAE kontakt inhibisyon grubunun %63,23 oranı ile en düşük DNA metilasyon oranını verdiği görülmektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-25). Lipofectamine® Roscovitine grubu da %78,49 oranı ile bu gruptan sonra gelmektedir ($p \leq 0,01$; Tablo 4-25).

SCNT yönteminde hücre çeşidinin başarıyı etkilemediği bilinmektedir. Fakat fetal fibroblastlar hızlı üreme ve çok sayıda pasajlanabilme yetenekleri olduğundan diğer hücrelere göre daha ön planda olup, araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. Erişkin fibroblastlara bakıldığında ise, elde edilmeleri fetal fibroblastlara göre daha mümkün olduğundan araştırmacılara daha kolay primer kültür oluşturabilme avantajı sağlamaktadır.

Çalışmada sonuçların tamamına genel olarak bakılıp; hücre siklus dağılımları, apoptotik aktivite oranları ve DNA metilasyon oranları beraber değerlendirildiğinde PKF hücrelerinin PKEF hücrelerine göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Özellikle hücre siklus senkronizasyonunun daha başarılı olduğu ve DNA metilasyon oranlarının daha düşük olduğu görülmüştür. PKF hücrelerinde PBAE ve Lipofectamine® transfeksiyon ajanlarının ikisinde de Trichostatin A ve kontakt inhibisyon grupları yüksek G0/G1 fazı ve canlı hücre oranları ve düşük metillenme oranları göstermeleri ile ön plana çıkmıştır. Roscovitine gruplarında canlı hücre oranları iyi olmasına rağmen, diğer gruplara kıyasla G0/G1 fazındaki hücre oranlarının düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da Roscovitine inhibitörünün koyun hücrelerinde, sığır hücrelerinde olduğu gibi hücre senkronizasyonunda başarılı olamadığı dikkat çekmektedir.

Etkili birçok faktörün yanı sıra, hücrelerde apoptozun klonlamanın başarısında önemli bir rol oynadığı ve sağlıklı gelişimin bir göstergesi olarak değerlendirilmesi gerektiği bilinmektedir (Feugang ve ark., 2002). Embriyogenezis anomalileri, artan mozaizm durumları, poli-ploitlik gibi durumlar çoğunlukla donör hücrelerde görülen apoptoza bağlı fragmentasyon sonucunda şekillenmektedir. Özellikle de uzun süreli serum açlığı durumlarında, ciddi DNA fragmentasyonu oluşumu ve hücre canlılığına zararlı etkiler oluştuğu bilinmektedir (Kues ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmada da, iki hücre hattında da serum açlığına bırakma gruplarının yüksek G0/G1 oranı göstermesine rağmen erken apoptozis oranlarının da yüksek olduğu görülmüştür. Aynı şekilde transfeksiyon ajanlarının da apoptotik aktivite oranlarına bakıldığında, Lipofectamine®

gruplarının canlı hücre oranları PBAE gruplarına göre yüzdesel olarak daha yüksek gözükmesine rağmen, erken apoptozis oranları daha yüksek bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Nüklear transfer aşamasında hücre seçimlerinde canlı ve erken apoptotik hücrelerin natif muayenede ayrımlarının yapılamaması önemli bir sorundur.

Klon embriyoların sağlıklı gelişim sürecinde devam edebilmeleri için donör somatik hücrelerin genomik DNA'larında görülen hipermetilasyonun demetile olarak hipometilasyona dönüşümü sağlanmalıdır. Bu anlamda, klon embriyolarda sağlıklı embriyoların geçirdiği demetilasyon dalgası sağlanamadığı takdirde görülen yeniden programlamadaki başarısızlıkların SCNT teknolojisinde yaşanılan sorunların en önemli sebebi olduğu düşünülmektedir (Armstrong ve ark., 2006).

SCNT embriyolarında yapılan araştırmalara bakıldığında, klon sığır ve koyun blastosistlerinin yaklaşık %50'sinde DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunda hatalar olduğu ve belirli kromozomlarda yüksek oranlarda metillenme oluştuğu görülmüştür (Armstrong ve ark., 2006).

Blelloch ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada farklılaşmış donör hücre genomunun global hipometilasyonunun SCNT etkinliğini artırdığını göstermişlerdir. Gao ve ark. da 2018 yılında yaptıkları çalışma ile gelişimsel olarak duraklamış olan embriyoların, başarılı bir şekilde blastosist aşamasına devam etmiş olan embriyolarla karşılaştırıldıklarında yüksek DNA metilasyon seviyeleri gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Matoba ve ark. 2018 (a) yılında yapmış oldukları çalışmada MEF (fare embriyonik fibroblast) hücreleri ile yapmış oldukları nüklear transfer sonrasında SCNT blastositleri ve kontrol grubu olan IVF blastosistlerinde DNA metilasyon seviyelerine bakmış ve iyi programlanmış olan SCNT blastosistlerinin %15,6 gibi düşük bir metilasyon oranıyla, %19,1 metilasyon oranı gösteren IVF blastosistleriyle benzer sonuç verdiğini görmüşlerdir. Aynı çalışmada MEF hücrelerinin (%78) yüksek oranda metillenme gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Sunulan çalışmada da PKEF hücrelerinin yüksek oranda metillenme gösterdiği görülmüştür.

Diao ve ark. 2013 yılında domuz fötal fibroblastların SCNT çalışmasında donör hücre olarak kullanılması öncesinde epigenetik programlama amaçlı 5-Aza-dc ve Trichostatin A uygulamış, yapılan DNA metilasyon analizlerinde 5-Aza-dc (%55), Trichostatin A (%60) ve bu inhibitör maddelerinin beraber (%51) uygulamalarının

metilasyon sonuçlarının muamele edilmemiş hücrelerle (%65) istatistiksel açıdan benzer olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çiftlik hayvanlarında klon yavruların eldesinin araştırma, hayvancılık, biyoteknoloji gibi alanlarda büyük avantaj sağladığı bilinen bir gerçektir. Embriyo yapılandırılması öncesinde gen hedeflenebilmesi ve hücre popülasyonlarının seçilebilmesi ile SCNT teknolojisi hızlı genetik ilerleme ve popülasyonların modifikasyonu için tercih edilebilecek önemli bir teknolojidir.

Yakın gelecekte, çiftlik hayvan üretiminin gelişmekte olan genetik mühendisliği ve transgenik ilerlemelerin de etkisiyle insana yönelik ihtiyaçların karşılanması için daha da ön plana çıkarak gelişmesi ve önemli bir yere gelmesi beklenmektedir. Gıda üretiminin yanı sıra, yeni ürünlerin geliştirilmesi, büyüme, üreme ve hastalık direncinin gelişmesi bu ilerlemenin beklenen etkileridir. Genetik olarak geliştirilmiş çiftlik hayvan üretimi, gen terapisi, ksenotransplantasyon ve daha birçok biyoteknolojik ilerlemenin de etkisiyle bizleri insan hayatını kolaylaştıran ve tamamlayan bir transgenik gelecek beklemektedir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ışığında;

1. Transgenik primer koyun fibroblast hücre hatları üretmede PBAE'nin ticari ürün olan Lipofectamine®'e göre transfeksiyon etkinliğine bakıldığında daha iyi sonuç verdiği,
2. PBAE ile yapılan transfeksiyon çalışmalarında apoptoz ve membranı sağlam hücre ile canlılık oranları açısından en iyi sonucu vereceği,
3. nmChi ve LDH'ın transgenik primer koyun fibroblast hücre hatları üretmede transfeksiyon etkinliğinin çok düşük olduğu ve bu gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmeye ihtiyaç olduğu,
4. pEGFP-N1 geni ile transfekte primer erişkin ve embriyonik koyun fibroblast hücrelerinin seleksiyonunda G418'in 800 µg/µL konsantrasyonda kullanılmasının uygun olduğu,
5. SCNT amaçlı kullanılacak donör hücrelerin hücre sikluslarının G0/G1 hücre ve canlı hücre oranları açısından en iyi şekilde Trichostatin A ve kontakt inhibisyon yöntemleriyle elde edilebileceği,

6. Roscovitine inhibitörünün koyun SCNT çalışmalarına yönelik olarak primer erişkin ve embriyonik fibroblastlardan donör hücre hazırlığı için hücre siklusunu senkronize etmeye uygun olmadığı,
7. Trichostatin A inhibitörünün transgenik koyun primer fibroblast hücre hatlarının hücre siklusu senkronizasyonunda başarılı bir şekilde kullanılabileceği,
8. Transfekte primer koyun erişkin fibroblast hücrelerinin primer koyun embriyonik fibroblastlarına göre transfeksiyon işlemine daha iyi yanıt verdiği,
9. Transfekte primer koyun erişkin fibroblast hücrelerinin primer koyun embriyonik fibroblastlara göre Trichostatin A ile programlamada daha iyi yanıt verdiği,
10. Her iki hücre hattında da serum açlığına bırakmanın daha etkin hücreleri senkronize ettiği,
11. Serum açlığının her iki hücre hattında da erken apoptoz, geç apoptoz ve ölü hücre oranlarında artışa neden olduğu,
12. PBAE ile transfekte edilen primer koyun erişkin fibroblast hücrelerinde kontakt inhibisyon, serum açlığı ve Trichostatin A ile en yüksek G0/G1 hücre oranı elde edilebileceği,
13. Lipofectamine® kullanıldığında serum açlığına bırakılarak en yüksek G0/G1 hücre oranı elde edilebileceği,
14. Transfekte primer koyun erişkin fibroblastlarında 50 nM Trichostatin A kullanıldığında en düşük metillenme oranı sağlandığı,
15. Donör primer koyun erişkin fibroblast hücre hatlarında metilasyon seviyelerinin düşürülmesinde en etkili yöntemin Trichostatin A olduğu,
16. Primer koyun embriyonik fibroblastlarının primer koyun erişkin fibroblastlara göre normalinde daha yüksek metilasyon seviyesine sahip olduğu,
17. Primer koyun erişkin fibroblastların metilasyon inhibitörlerine daha iyi yanıt verebileceği,
18. Koyunlarda SCNT'ye yönelik yapılacak çalışmalarda primer erişkin fibroblastlarının, hem hücre siklusu senkronizasyonuna hem de metilasyon

seviyelerinin düşürülmesine yönelik daha iyi yanıt verdiğinden başarıyı destekleyici fırsat sunabileceği,

19. Transfeksiyon sonuçları, transfekte hücrelerdeki G0/G1 aşamasına senkronize edilen hücre oranları, hücrelerde yaşanan ölüm ve apoptotik değişiklikler ile metilasyon seviyelerinde sağlanan düşüşler göz önünde bulundurulduğunda, PBAE yöntemi ile elde edilmiş transfekte primer koyun erişkin fibroblast hücre hatlarında bu çalışma ile ilk kez denenmiş olan 50 nM Trichostatin A ile inkübasyon yönteminin en etkin yöntem olabileceği,

söylenebilir.

KAYNAKLAR

Aguirre A, Castro-Palomino N, De la Fuente J, Ovidio Castro FO (1998) Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous WAP gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. Transgenic Res 7: 311-317.

Akagi S., Adachi N., Matsukawa K., Kubo M., Takahashi S. (2003) Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. Mol Reprod Dev 66:264-72.

Akagi S., Matsukawa K., Mizutani E., Fukunari K., Kaneda M., Watanabe S., et al. (2011) Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. J Reprod Dev 57: 120-6.

Arat, S., Rzucidlo, J., Gibbons, J., Miyoshi, K., Stice, S.L. (2001) Production of transgenic bovic embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. Mol. Reprod. Dev. 60, 20–26.

Arat S., Caputcu A.T., Akkoc T., Pabuccuoğlu S., Sagirkaya H., Cirit U. ve ark. (2011) Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. Reproduction Fertility and Development, cilt 23, 1012-1023.

Armstrong L., Lako M., Dean W., Stojkovic M. (2006) Epigenetic modificiation is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. Stem Cells, 24:805-814.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (2003) Current protocols in molecular biology. ISBN:047150338X

Ayares, D. (1999) Gene targeting in livestock. Transgenic Res. 8, 469–470.

Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempes M.M., Cammuso C., Williams J.L., Nims S.D., Porter C.A., Midura P., Palacios M.J., Ayres S.L., Denniston R.S., Hayes M.L., Ziomek C.A., Meade H.M., Godke R.A., Gavin W.G., Overström E.W., Echelard Y. (1999) Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat Biotechnol., 17(5):456-61.

Bawden, C.S., Dunn, S.M., Mclaughlan, J., Nesci, A., Powell, B.C., Walker, S.K., Rogers, G.E. (1999) Transgenesis with ovine keratin genes: expression in the sheep wool follicle for fibres with new properties. Transgenic Res. 8, 459 – 461.

Beaujean N., Taylor J., Gardner J., Wilmut I., Meehan R., Young L. (2004) Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. Biology of Reproduction Vol 71, issue 1, 185-193.

Bernards, A., Hariharan, I.K. (2001) Of flies and men studying human disease in Drosophila. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 274–278.

Bhise N.S., Wahlin K.J., Zack D.J., Green J.J. (2013) Evaluating the potential of poly(beta-amino ester) nanoparticles for reprogramming human fibroblasts to become induced pluripotent stem cells. Int J Nanomedicine 8:4641-4658.

Birler S., Pabuccuoğlu S., Demir K., Cirit Ü., Karaman E., Bacınoğlu S., ve ark. (2010) Production of cloned lambs: transfer of early cleavage stage embryos to final recipients. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., cilt 36, 1-8.

Björklund, A. (1991) Neural transplantation an experimental tool with clinical possibilities. Trends Neurosci. 14, 319–322.

Blelloch R., Wang Z., Meissner A., Pollard S., Smith A., Jaenisch R. (2006) Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. Stem Cells 24: 2007-2013.

Bosze, S., Hiripi, L., Baranyi, M., Szabo, L., Toth, S., Devinoy, E. (2001) Altering milk quality by transgenesis. In: Toutant, J.P., Balazs, E. (Eds.), Molecular Farming Proceedings of the OCED, INRA Editions. Workshop held in La Grande Motte, France, pp. 29–38.

Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. (1999) Flow cytometric cell cycle analysis of porcine fetal fibroblast cells. Bio Reprod 60:1013-1019.

Brackett, B.G., Boranska, W., Sawicki, W., Koprowski, H. (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 353–357.

Braude P., Bolton V., Moore S. (1988) Human gene expression first occurs between the four and eight cell stages of preimplantation development. Nature 332:459-461.

Bremel, R.D., Yom, H.-C., Bleck, G.T. (1989) Alteration of milk composition using molecular genetics. J. Dairy Sci. 72, 2826–2833.

Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G (2003) Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nat Biotechnol 21: 157-162.

Brown, S.D., Balling, R. (2001) Systematic approaches to mouse mutagenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 268–273.

Buehler, T.A., Bruyere, T., Went, D.F., Stranzinger, G., Buerki, K. (1990) Rabbit-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. Biotechnology 8, 140–143.

Bui H., Wakayama S., Kishigami S., Park K., Kim J., Thuan N.V., Wakayama T. (2010) Effect of Trichostatin A on chromatin remodeling, histone modifications, DNA replication and transcriptional activity in cloned mouse embryos. Biology of Reproduction 83, 454-463.

Campbell K.H.S., Ritchie W.A., Wilmut I. (1993) Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. Biology of Reproduction 49, 933-942.

Campbell K.H.S., Loi P., Cappai P., Wilmut I. (1994) Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. Biology of Reproduction 50: 1385-1393.

Campbell K.H.S., Loi P., Otaegui P.J., Wilmut I. (1996) Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. Reviews of Reproduction 1, 40-46.

Campbell K.H.S., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 380:64-6.

Campbell K.H.S. (1999) Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle. Cloning Volume 1, Number 1, 3-15.

Campbell K.H.S., Alberio R. (2003) Reprogramming the genome: role of the cell cycle. Reproduction Supplement 61: 477-494.

Campbell K.H.S., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D.W., Lee J.H., Xhu J. (2007) Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. Theriogenology 68S,214-231.

Camper, S.A., Saunders, T.L., Kendall, S.K., Keri, R.A., Seasholtz, A.F., Gordon, D.F., Birkmeier, T.S., Keegan, C.E., Karolyi, I.J., Roller, M.L., Burrows, H.L., Samuelson, L.C. (1995) Implementing transgenic and embryonic stem cell technology to study gene expression, cell–cell interactions and gene function. Biol. Reprod. 52, 246– 257.

Can A., Yağcıoğlu S., Coşkun N., Arıcı R., Bakırer Öztürk G., Yılmaz Ö.T., Marh J., Demir K., Kaymaz F.A., Turan K., Evecen M., Pabuccuoğlu S., Moisyadi S., Birler S.

(2015) Comparing efficiency of microinjection methods on transgenic rabbit embryo production. WG/MC/Scientific Meeting of COST Action BM1308 Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM, Poznan, Polonya, 13 - 16 Aralık 2015, ss.13

Castilla, J., Pintado, B., Sola, I., Sanchez-Morgado, J.M., En- juanes, L. (1998) Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk. Nature Biotechnol. 16, 349–354.

Chanat E., Martin,P., Ollivier-Bousquet, M. (1999) Alpha(S1)-casein is required for the efficient transport of beta and kappa-casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. J. Cell. Sci. 112, 3399– 3412.

Chen C.K., Huang P.K., Law W.C., Chu C.H., Chen N.T., Lo L.W. (2020) Biodegradable polymers for gene-delivery applications. International Journal of Nanomedicine vol:15, 2131-2150.

Chen CM, Wang CH, Wu SC, Lin CC, Lin SH, Cheng WT (2002) Temporal and spatial expression of biologically active human factor VIII in the milk of transgenic mice driven by mammary-specific bovine α-lactalbumin regulation sequences. Transgenic Res 11: 257-268.

Chesne, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard, J.P. (2002) Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature Biotech- nol. 70, 366–369.

Cho J.K., Lee B.C., Park J.I., Lim J.M., Shin S.J., Kim K.Y., Lee B.D., Hwang W.S. (2002) Development of bovine oocytes reconstructed with different donor somatic cells with or without serum starvation. Theriogenology 57, 1819– 1828.

Cho S.R., Ock S.A., Yoo J.G., Mohana kumar B., Choe S.Y., Rho G.J. (2005) Effects of confluent, Roscovitine treatment and serum starvation on the cell-cycle synchronization of bovine foetal fibroblasts. Reprod. Dom. Anim 40, 171-176.

Cho K., Wang X., Nie S. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. Clin. Cancer Res. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.

Cibelli J.B., Stive S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. (1998) Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. Science 280, 1256-1258.

Collodi, P., 2001. Embryo cell cultures for cell-mediated gene transfer and the production of transgenic zebrafish. Trans- genic Animal Research Conference III. Tahoe City, Cali- fornia, USA, pp. 39.

Cozzi, E., White, D.J.G. (1995) The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. Nat. Med.1, 964–966.

Czernik M., Anzalone D.A., Palazzese L., Oikawa M., Loi P. (2019) Somatic cell nuclear transfer: failures, successes and the challenges ahead. Int J Dev Biol 63:123-130.

Çelik S., Li Y., O'Neill C. (2014) The exit of mouse embryonic fibroblasts from the cell-cycle changes the nature of solvent exposure of the 5'-methylcytosine epitope within chromatin. Plos One Vol 9, issue 4, e92523.

Dai, Y., Vaught, T.D., Boone, J., Chen, S.-H., Phelps, C.J., Ball, S., Monahan, J.A., Jobst, P.M., McCreath, K.J., Lamborn, A.E., Cowell-Lucero, J.L., Wells, K.D., Col- man, A., Polejaeva, I.A., Ayares, D.L. (2002) Targeted disruption of the 1,3-galactosyltransferase gene in clone pigs. Nature Biotechnol. 20, 251–255.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Kott, S., Edge, A., Penney, D., Kassissieh, S., Dempsey, P., Isacson, O. (1997) Histological evidence of fetal pig neutral cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat. Med. 3, 350–353.

Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E., Reik W. (2001) Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. Proc Natl Acad Sci U S A.;98(24):13734-8.

Dean W., Santos F., Reik W. (2003) Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. Cell & Development Biology 14, 93-100.

Demir K., Pabuccuoğlu S., Cirit Ü., Evecen M., Karaman E., Özdaş Ö.B., et al. (2019) Effects of serum starvation and ionomycin activation on the development of somatic cell nuclear transfer embryos in sheep. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt 66, 37-42.

Denning, C., Burl, S., Ainslie, A., Bracken, J., Dinnyes, A., Fletcher, J., King, T., Ritchie, M., Ritchie, W.A., Rollo, M., De Sousa, P., Travers, A., Wilmut, I., Clark, A.J. (2001) Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. Nature Biotechnol. 19, 559 – 562.

Diao Y.F., Naruse K.J., Han R.X., Li X.X., Oqani R.K., Lin T., Jin D.I. (2013) Treatment of fetal fibroblasts with DNA methylation inhibitors and/or histone deacetylase inhibitors improves the development of porcine nuclear transfer-derived embryos. Animal Reproduction Science 141, 164-171.

Ding X., Wang Y., Zhang D., Wang Y., Guo Z., Zhang Y. (2008) Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2-deoxycytidine and trichostatin A. Theriogenology 70:622-630.

Dyck MK, Lacroix D, Pothier F, Sirard MA. (2003) Making recombinant proteins in animals: different systems, different applications. Trends Biotechnol 21:394–9.

Ebert, K.M., Selgrath, J.P. (1991) Changes in domestic livestock through genetic engineering. In: Pedersen, R.A., McLaren, A., First, N.L. (Eds.), Current Communication in Cell and Molecular Biology: Animal Applications of Research in Mammalian Development, pp. 233–266.

Edge, A.S.B., Gosse, M.E., Dinsmore, J. (1998) Xenogenic cell therapy: current progress and future developments in porcine cell transplantation. Cell Transplant. 7, 525–539.

Elsheikh A.S., Takahashi Y., Katagiri S., Kanagawa H. (1998) Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. Jpn J Vet Res 45,217-220.

Enright B.P., Kubota C., Yang X., Tian X.C. (2003) Epigenetic characterics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. Biology of Reproduction 69, 896-901.

Eren A., Arat S., Tuna M., Bircan R. (2014) Effects of confluency, roscovitine and serum starvation on the cell-cycle synchronization and viability of sheep and goat adult fibroblasts. Journal of Biotechnology 1855.

Evans M.J., Gurer C., Loike J.D., Wilmut I., Schnieke A.E., Schon E.A. (1999) Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. Nat Genet. 1999 September; 23(1):90-93.

Evecen M., Pabuccuoğlu S., Demir K., Yagcioglu S., Can A., Erturk E. ve ark. (2016) Somatic cloning in cats using MI and MII oocytes. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt 22, 923-928.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413–7417.

Feugang J.M., Roover D., Leonard S., Dessy F., Donnay I. (2002) Kinetics of apoptosis in preimplantation bovine embryos produced in vitro and in vivo. Theriogeneology 57: 494.

Fink, J.S., Schumacher, J.M., Ellias, S.L., Palmer, E.P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHoorne, C., Kott, H.S., Dempsey, P.K., Fischman, A.J.,

Raineri, R., Manhart, D., Dinsmore, J., Isacson, O. (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. Cell Transplant. 2, 273–278.

Forano C, Costantino U., Prevot V., Taviot Gueho, C. (2013) Layered double hyroxides (LDH), in: Bergaya F., Lagaly G., (Eds.), Handbook of Clay Science, 2nd edition. Part A: Fundamentals, Developments in Clay Science, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp.745-782.

Forsberg, E.J., Betthauser, J., Strelchenko, N., Golueke, P., Childs, L., Jurgella, R., Koppang, G., Mell, G., Pace, M.M., Bishop, M. (2001) Cloning non-transgenic and transgenic cattle. Theriogenology 55, 269 (abstract).

Fulka Jr J., Moor R.M. (1993) Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. Mol Reprod Dev 34:427-30.

Gagne, M.B., Pothier, F., Sirad, M.A. (1991) Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. Mol. Reprod. Dev. 29, 6–15.

Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G. (2003) Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. Nature 424, 635.

Galli C., Lagutina I., Perota A., Colleoni S., Duchi R., Lucchini F. and Lazzari G. (2012) Somatic cell nuclear transfer and transgenesis in large animals: current and future insights. Reprod Dom Anim 47, Suppl. 3, 2-11.

Gandolfi, F., Lavitrano, M., Camaioni, A., Spadafora, C., Siracusa, G., Lauria, A. (1989) The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs, J. Reprod. Fertil. 4 (10) (abstract).

Gao S., McGarry M., Latham K.E., Wilmut I. (2003) Cloning of mice by nuclear transfer. Cloning Stem Cells 5:287-94.

Gao R., Wang C., Gao Y., Xiu W., Chen J., Kou X., Zhao Y., Liao Y., Bai D., Qiao Z., Yang L., Wang M., Zang R., Liu X., Jia Y., Li Y., Zhang Y., Yin J., Wang H., Wan X., Liu W., Zhang Y., Gao S. (2018) Inhibition of aberrant DNA remethylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. Cell Stem Cell 23: 426-435.

Gheisari Y., Soleimani M., Azadmanesh K., Zeinali S. (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. Cytotherapy 8:815-823.

Gibbons J., Arat S., Rzucidlo J., Miyoshi K., Waltenburg R., Respess D., Venable A., Stice S. (2002) Enchanced survivability of cloned calves derived from Roscovitine-treated adult somatic cells. Biology of Reproduction 66, 895-900.

Golovan, S.P., Hayes, M.A., Phillips, J.P., Forsberg, C.W. (2001) Transgenic mice expressing bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. Nat. Biotechnol. 19, 429–433.

Gomez M.C., Pope C.E., Ricks D.M., Lyons J., Dumas C., Dresser B.L. (2009) Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. Reprod Fertil Dev 21:76-82.

Gordon, M.F., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7380–7384.

Gök M.K. (2012) Doğal ve sentetik biyouyumlu polimerik nanopartiküler gen taşıyıcı sistemlerin elde edilmesi ve transfeksiyon etkinliğinin incelenmesi. Tez no:325617.

Gök M.K., Demir K., Cevher E., Özgümüş S., Pabuccuoğlu S. (2019) Effect of the linear aliphatic amine functionalization on in vitro transfection efficiency of chitosan nanoparticles. Carbonhydrate polymers, vol 207, 580-587.

Groth, C.G., Korsgren, O., Tibell, A., Tollemar, J., Möller, E., Bolinder, J., Östman, J., Reinholt, F.P., Hellerström, C., Andersson, A. (1994) Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. Lancet 344, 1402–1404.

Holker M., Petersen B., Hassel P., Kues W.A., Lemme E., Lucas-Hahn A., Niemann H. (2005) Duration of in vitro maturation of recipient oocytes affects blastocyst development of cloned porcine embryos. Cloning Stem Cells 7, 35– 44.

Houdebine, L.M. (2000) Transgenic animal bioreactors. Transgenic Res. 9, 305–320.

Houdebine L.M. (2002) The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. Journal of Biotechnology 98, 145-160.

Houdebine L.M. (2002) Transgenesis to improve animal production. Livestock Production Science 74, 255-268.

Houdebine L.M. (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 32: 107-121.

Hu S., Ni W., Chen C., Sai W., Hazi W., He Z., Meng R., Guo J. (2012) Comparison between the effects of valproic acid and trichostatin A on in vitro development of sheep

somatic cell nuclear transfer embryos. Journal of Animal and Veterinary Advances 11 (11): 1868-1872.

Ibanez E., Albertini D.F., Overstrom E.W. (2003) Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning: coordination between cell-cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion. Biol Reprod 68:1249-58.

Inoue K., Wakao H., Ogonuki N., Miki H., Seino K., Nambu-Wakao R.,et al. (2005) Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. Curr Biol 15:1114-18.

Ishii T., Okahata Y., Sato T. (2001) Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. Bio et Bio Acta - Biomembranes vol 1514, issue 1, 51-64.

Jang G., Park E.S., Cho J.K., Bhuiyan M.M., Lee B.C., Kang S.K., et al. (2004) Preimplantational embryo development and incidence of blastomere apoptosis in bovine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed with long-term cultured donor cells. Theriogenology 62:512-21.

Jarrell V.L., Day B.N., Prather R.S. (1991) The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, sus scrofa; quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. Biol Reprod 44:62-68.

Kang, Y.K., Koo, D.B., Park, J.S., Choi, Y.H., Chung, A.S., Lee, K.K., Han, Y.M. (2001) Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. Nat. Genet. 28, 173–177.

Kasinathan P., Knott J.G., Wang Z., Jerry D.J., Robl J.M. (2001) Production of calves from G1 fibroblasts. Nat Biotechnol 19:1176-8.

Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yause H., Tsunoda Y. (1998) Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. Science 282: 2095-2098.

Keefer C.L. (2015) Artificial cloning of domestic animals. Proc Natl Acad Sci USA 112:8874-8878.

Kerr, D.E., Plaut, K., Bramley, A.J., Williamson, C.M., Lax, A.J., Moore, K., Wells, K.D., Wall, R.J. (2001) Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotechnol. 19, 66–70.

Kim T.K., Eberwine J.H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397:3173-3178.

Kim J., Sunshine J.C., Green J.J. (2014) Differential polymer structure tunes mechanism of cellular uptake and transfection routes of poly (β-amino ester) polyplexes in human breast cancer cells. Bioconjugate chemistry 25, 1, 43-51.

Kishigami S., Mizutani E., Ohta H., Hikichi T., Thuan N.V. ve ark. (2006) Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. Biochem. Biophys. Res. Commun, 340: 183-189.

Kishigami S., Bui H.T., Wakayama S., Tokunaga K., Van Thuan N., Hikichi T., et al. (2007) Successful mouse cloning of an outbred strain by trichostatin A treatment after somatic nuclear transfer. J Reprod Dev 53:165-70.

Kolb, A.F., Ansell, R., McWhir, J., Siddell, S.G. (1999) Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination. Gene 227, 21–31.

Koo O.J., Hossein M.S., Hong S.G., Martinez-Conejero J.A., Lee B.C. (2009) Cell cycle synchronization of canine ear fibroblasts for somatic cell nuclear transfer. Zygote 17, 37– 43.

Kumar D., Ranjan R., Singh A.P., Sarkhel B.C. (2017) Cellular reprogramming of adult goat fibroblast: toward pluripotency. Indian J Anim Res 51: 52-57.

Kues W.A., Anger M., Carnwarth J.W., Motlik J., Niemann H. (2000) Cell cycle synchronization of porcine fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. Biol Reprod 62:412-419.

Ladewig K., Niebert M., Xu Z.P., Gray P.P., Lu G.Q. (2010) Controlled preparation of layered double hydroxide nanoparticles and their application as gene delivery vehicles. Applied Clay Science 48(1–2):280-289

Lagutina I., Lazzari G., Galli C. (2006) Birth of cloned pigs from zona-free nuclear transfer blastocysts developed in vitro before transfer. Cloning Stem Cells 8, 283-293.

Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.-W., Cheong, H.-T., Greenstein, J.L., Im, G.-S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B.N., Murphy, C.N., Carter, D.B., Hawley, R.J., Prather, R.S. (2002) Production of 1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. Science 295, 1089–1092.

Latham K.E. (1999) Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. In Rev Cytol 193:71-124.

Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G., Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. Cell 57, 717–723.

Lee JW, Wu SC, Tian XC, Barber M, Hoagland T, Riesen J, Lee KH, Tu CF, Cheng WT, Yang X (2003) Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. Biol Reprod 69: 995-1001.

Lee G.S., Kim H.S., Hyun S.H., Lee S.H., Jeon H.Y., Nam D.H., Jeong Y.W., Kim S., Kim J.H., Han J.Y., Ahn C., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2005) Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein. Theriogenology 63, 973– 991.

Lee K., Uh K., Farrell K. (2020) Current progress of genome editing in livestock. Theriogenology.

Li E. (2003) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nature Genetics, Volume 3 662-673.

Li J., Svarcova O., Villemoes K., Kragh P.M., Schmidt M., Bogh I.B., Zhang Y., Du Y., Lin L., Purup S., Xue Q., Bolund L., Yang H., Maddox-Hyttel P., Vajta G. (2008) High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. Theriogenology 70:800-808.

Liliensiek S.J., Schell K., Howard E., Nealey P., Murphy C.J. (2006) Cell sorting but not serum starvation is effective for SV40 human corneal epithelial cell cycle synchronization. Exp Eye Res.: 83(1): 61-68.

Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C. (2007) Oviduct specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. Proc Natl Acad Sci USA, 104: 1771-6.

Liu H., Liu C., Zhao Y., Han X., Zhou Z., Wang C., Li R., Li X. (2018a) Comparing successful gene knock-in efficiencies of CRISPR/Cas9 with ZFNs and TALENs gene editing systems in bovine and dairy goat fetal fibroblasts. Journal of Integrative Agriculture Vol 17:406-414.

Liu Z., Cai Y., Wang Y., Nie Y., Zhang C., Xu Y. et al (2018b) Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. Cell 172:881-887.

Loi P., Ledda S., Fulka J., Cappai P., Moor R.M. (1998) Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. Biol Reprod 58:1177-87.

Loi P., Czernik M., Zacchini F., Iuso D., Scapolo P.A., Ptak G. (2013) Sheep: The first large animal model in nuclear transfer research. Cellular Reprogramming Vol 15, Number 5, 367-373.

Long C.R., Westhusin M.E., Golding M.C. (2014) Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer. Molecular Reproduction & Development 81:183-193.

Lotti S.N., Polkoff K.M., Rubessa M., Wheeler M.B. (2017) Modification of the genome of domestic animals. Anim Biotechnol 28:198-210.

Luo, D., Saltman, W.M. (2003) Synthetic DNA Delivery Systems, Landes Bioscience, Eurekah.Com And Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, 0-306-47701-7.

Machaty Z., Rickords L.F., Prather R.S. (1999) Parthenogenetic activation of porcine oocytes after nuclear transfer. Cloning 1:101-110.

Margawati E.T. (2003) Transgenic animals: their benefits to human welfare. Action bioscience.

Markaki M., Drabek D., Livadaras I., Craig R.K. (2007) Stable expression of human Growth Hormone over 50 generations in transgenic insect larvae. Transgenic Res 16:99–107.

Matoba S., Wang H., Jiang L., Lu F., Iwabuchi K.A., Wu X., Inoue K., Yang L., Press W., Lee J.T., Ogura A., Shen L., Zhang Y. (2018a) Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. Cell Stem Cell Volume 23, issue 3, 343-354.

Matoba S. and Zhang Y. (2018b) Somatic cell nuclear transfer reprogramming: mechanisms and applications. Cell Stem Cell 23:471-485.

McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J. (2000) Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. Nature 405, 1066–1069.

McPherron, A.C., Lee, S.J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12457–12461.

Meng Q., Polgar Z., Liu J., Dinnyes A. (2009) Live birth of somatic cell-cloned rabbits following trichostatin A treatment and co-transfer of parthenogenetic embryos. Cloning Stem Cells 11:203-208.

Muir, W.M., Howard, R.D. (1999) Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: sexual selection and the Trojan gene hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13853–13856.

Niemann H., Kues W.A. (2003) Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. Animal Reproduction Science 79, 291-317.

Niemann H, Kues WA (2007) Transgenic farm animals: an update. Reprod Fertil Dev 19: 762-770.

Niu D., Wei H.J., Lin L., George H., Wang T., Lee I.H., et al (2017) Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. Science 357:1303-1307.

Oback B., Wiersema A.T., Gaynor P., Laible G., Tucker F.C., Oliver J.E., Miller A.L., Troskie H.E., Wilson K.L., Forsyth J.T., Berg M.C., Cockrem K., McMillan V., Tervit H.R., Wells D.N. (2003) Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. Cloning Stem Cells 5, 3-12.

Oh H.J., Hong S.G., Park J.E., Kang J.T., Kim M.J., Kim M.K., Kang S.K., Kim D.Y., Jang G., Lee B.C. (2009) Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. Theriogenology vol 72: 461-470.

Ogura A., Inoue K., Ogonuki N., Noguchi A., Takano K., Nagano R. et al. (2000) Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. Biol Reprod 62:1579-84.

Ogura A., Inoue K., Wakayama T. (2013) Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. Phil Trans R Soc B 368:1-12.

Öztürk G.B. (2013) Transgenik embriyo üretimi için koç spermatozoonlarının farklı yöntemlerle transfekte edilmesi. Tez no:347610

Park K., Lai L., Cheong H., Cabot R., Sun Q., Wu G., Rucker E.B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Prather R.S. (2002) Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. Biol Reprod, 66(4):1001-5.

Park H.J., Koo O.J., Kwon D.K., Kang J.T., Jang G., Lee B.C. (2010) Effect of roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos. Reprod Dom Anim 45, 1082-1088.

Patience, C., Takeuchi, Y., Weiss, R.A. (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. Nat. Med. 3, 282–286.

Perez, A., Solano, R., Castro, R., Lleonart, R., de Armas, R., Martinez, R., Aguilar, A., Herrera, L., de la Fuente, J. (1991) Sperm cells mediated gene transfer in cattle. Biotechnol. Aplicada 8, 90–94.

Perry A.C., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y. (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science 284:1180–3.

Petitte J.N., Yang, Z., Liu, G., Kulik, M., Borwornpinyo, S. (2002) Primordial germ cells, embryonic stem cells and transgenic poultry. Abstracts of the 3rd UC Davis Transgenic Animal Research Conference, Tahoe City, California, 9–13 September 2001, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 32–33.

Pursell, V.G., Mitchell, A.D., Wall, M.B., Solomon, M.B., Coleman, M.E., Schwartz, R.J. (2001) Transgenic research in enhance growth and lean carcass composition in swine. In: Toutant, J.P., Balazs, E. (Eds.), Molecular Farming, INRA Editions, pp. 77–86.

Rakyan, V.K., Preis, J., Morgan, H.D., Whitelaw, E. (2001) The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. Biochem. J. 356, 1–10.

Readeout, W.M. III, Wakayama, T., Wutz, A., Eggan, K., Jackson-Grubsy, L., Dausman, J., Yanagimachi, R., Jaenisch, R. (2000) Generation of mice from type and targeted ES cells by nuclear cloning. Nat. Gen. 24, 109– 110.

Recillas-Targa F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. Molecular Biotechnology Vol 34: 337-354.

Reggio B.C., James, A.N., Heather, L.G., Gavin, W.G., Behboodi, E. (2001) Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. Biol. Reprod. 65, 1528–1533.

Reik W., Dean W., Walter J. (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. Science 293:1089-1093.

Reiss M., Jastreboff, M.M., Bertino, J.R., Narayanan, R. (1986) DNA-mediated gene transfer into epidermal cells using electroporation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137, 244–249.

Renard J.P., Zhou Q., LeBourhis D., Chavatte-Palmer P., Hue I., Heyman Y., Vignon X. (2002) Nuclear Transfer Technologies: Between Success and Doubts. Theriogenology 57, 203-222.

Ribas R., Oback B., Ritchie W., Chebotareva T., Ferrier P., Clarke C., Taylor J., Gallagher E.J, Mauricio A.C., Sousa M., Wilmut I. (2005) Development of a zona-free method of nuclear transfer in Mouse. Cloning Stem Cells 7, 126-138.

Rodriguez-Osorio N., Urrego R., Cibelli J.B., Eilertsen K., Memili E. (2012) Reprogramming mammalian somatic cells. Theriogenology 78:1869-1886.

Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. Nature 323, 445–448.

Robl J.M., Wang Z., Kasinathan P., Kuroiwa Y. (2007) Transgenic animal production and animal biotechnology. Theriogenology 67:127-133.

Royer C., Jalabert A., Da Rocha M., Grenier A.M., Mauchamp B., Couble P. (2005) Biosynthesis and cocoon export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. Transgenic Res 14:463–72.

Rudolph, N.S. (1999) Biopharmaceutical production in transgenic livestock. TIBTECH 17, 367–374.

Saif, L.J., Wheeler, M.B. (1998) WAPping gastroenteritis with transgenic antibodies. Nature Biotechnol. 16, 334–335.

Saini M., Selokar N.L., Revey T., Singla S.K., Chauhan M.S., Palta P., Madan P. (2014) Trichostatin A alters the expression of cell cycle controlling genes and microRNAs in donor cells and subsequently improves the yield and quality of cloned bovine embryos in vitro. Theriogenology 82, 1036-1042.

Salamone D., Bevacqua R., Bonnet F.P., Gambini A., Canel N., Hiriart M.I., Vichera G., Moro L., Jarazo J. (2011) Recent advances in micromanioulation and transgenesis in domestic mammals. Acta Scientiae Veterinariae 39 (Suppl 1): s285-s293.

Salamone D., Bevacqua R., Hiriart M.I., Buemo C., Luchetti C., Moro L., Fernandez-Martin R. (2012) Transgenesis in farm animals. Anim. Reprod., v.9, n.4, p.772-776.

Samiec M., Skrzyszowska M. (2011) Transgenic mammalian species, generated by somatic cell cloning, in biomedicine, biopharmaceutical industry and human nutrition/ dietetics – recent achievements. Polish Journal of Veterinary Sciences Vol. 14, No.2, 317-318.

Santos F., Dean W. (2004) Epigenetic reprogramming during early development in mammals. Reproduction 127, 643-651.

Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H.S. (1997) Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts. Science 1997, Vol 278 no.5346 pp.2130-2133.

Schurmann A., Wells D.N., Oback R. (2006) Early zygotes are suitable recipients for bovine somatic nuclear transfer and result in cloned offspring. Reproduction 132, 839-848.

Senapati S., Sarkar T., Das P., Maiti P. (2019) Layered double hydroxide nanoparticles for efficient gene delivery for cancer treatment. Bioconjugate Chem. 30, 10, 2544-2554.

Shin T., Kraemer D., Pryor J., Liu L., Rugila J., Howe L., Buck S., Murphy K., Lyons L., Westhusin M. (2002) Cell biology: a cat cloned by nuclear transplantation. Nature 415: 859.

Shin Y.M., Chang S.M., Kim B.C., Park C.S., Jin D.I. (2006) Efficiency of co-transfection of transgene and neo gene into goat and pig fetal fibroblasts. Rep Fert Dev 19:320.

Simons, J.P., McClenaghan, M., Clark, A.J. (1987) Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. Nature 328, 530–532.

Skrzyszowska M, Smorąg Z, Słomski R, Kątska-Książkiewicz L, Kalak R, Michalak E, Wielgus K, Lehmann J, Lipiński D, Szalata M, Pławski A, Samiec M, Jura J, Gajda B, Ryńska B, Pieńkowski M (2006) Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning. Biol Reprod 74: 1114-1120.

Skrzyszowska M, Samiec M, Słomski R, Lipiński D, Mały E (2008) Development of porcine transgenic nuclear-transferred embryos derived from fibroblast cells transfected by the novel technique of nucleofection or standard lipofection. Theriogenology 70: 248-259.

Smithies, (2001) Embryonic stem cells. In: Marshak, D.R., Gardner, R.I., Gottlieb, D. (Eds.), Stem cells biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 205 – 230.

Spadafora C. (2002) Sperm-mediated gene transfer: practical implications of a biological process, Transgenic Res. 11 82–83.

Spemann H. (1938) Embryonic development and induction. Hafner Publishing Company, New York. 210-211.

Sulabh S., Kumar A. (2018) Applications of transgenic animals in animal production and health. Agricultural reviews 39:169-174.

Sun X., Wang S., Zhang Y., Wang H., Wang L., Ying L., Li R., Li N. (2008) Cell-cycle synchronization of fibroblasts derived from transgenic cloned cattle ear skin: effects of serum starvation, roscovitine and contact inhibition. Zygote 16, 111– 116.

Susko-Parris J.L., Leibfreid-Rutledge M.L., Northey D.L., Schutzkus V., First N.L. (1994) Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. Dev. Biol. 166, 729-739.

Suzuki E., Nagata D., Yoshizumi M., Kakoki M., Goto A., Omata M., Hirata Y. (2000) Reentry into the cell cycle of contact-inhibited vascular endothelial cells by a phosphatase inhibitor. Possible involvement of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 275, 3637– 3644.

Symer, D.E., Bender, J. (2001) Genomic stability. hip-hopping out of control. Nature 411, 147–149.

Tachibana M., Amato P., Sparman M., Nuria Gutierrez M., Tippner-Hedges R., Ma H. et al (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. Cell 153:1228-1238.

Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., komoto, N., Thomas, J.L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirp, P., Fraser, M., Prudhomme, J.C., Couble, P. (1999) Germline transformation of the silkworm Bombyx mori L. using a piggyBac transposon-derived vector. Nat. Biotech. 18, 81–84.

Telford N.A., Watson A.J., Schultz G.A. (1990) Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. Mol Reprod Dev 26:90-100.

Telugu B.P., Park K.E., Park C.H. (2017) Genome editing and genetic engineering in livestock for advancing agricultural and biomedical applications. Mamm Genome 28:338-347.

Thibier,M. (2001) The animal embryo transfer industry in figures. IETS-Newsletter 19, 16–22.

Thomas, M., Northrup, R., Hornsby, P.J. (1997) Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. Nat. Med. 3, 978–983.

Turan-Özbaş S., Akbuğa J. (2010) Plasmid DNA-loaded chitosan/TPP nanoparticles for topical gene delivery. Drug Delivery Vol 18, issue 3, 215-222.

Türkiye yerli evcil hayvan genetik kaynaklarından bazılarının in vitro korunması ve ön moleküler tanımlanması - I (Türkhaygen-I) https://arastirma.tarimorman.gov.tr/lalahanhmae/Menu/18/Islah-Ve-Genetik-Bolumu

van Berkel, P.H., Welling, M.M., Geerts, M., van Veen, H.A., Ravensbergen, B., Salaheddine, M., Pauwels, E.K., Pieper, F., Nuijens, J.H., Nibbering, P.H. (2002) Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. Nat. Biotechnol. 20, 484–487.

van de Lavoir M.C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R. (2006) Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. Nature 441:766–9.

Varmus, H. (1998) Retroviruses. Science 240, 1427–1435.

Viville, S. (1997) Mouse genetic manipulation via homologous recombination. In: Houdebine, L.M. (Ed.), Transgenic Animal Generation and Use. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, pp. 307–323.

Vorhies, J.S., Nemunaitis, J.J. (2009) Synthetic Vs. Natural/Biodegredable Polymers For Delivery Of Shrna-Based Cancer Therapies. Methods İn molecular biology, macromolecular drug delivery, 480, 11-29.

Wakayama, T., Perry A.C., Zuccoti M., Johnson K.R. ve Yanagimachi R. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. Nature, 394: 369-374.

Wall, R.J., Hawk, H.W., Nel, N. (1992) Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. J. Cell. Biochem. 49, 113–120.

Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., McKnight, R.A., Pittius, C.W., Henninhausen, L. (1991) High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1696–1700.

Wall, R.J. (2001) Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. Nat. Biotechnol. 19, 66–70.

Wang X., Qu J., He H., Liu Z., Huan Y. (2020) Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. Frontiers in Genetics 11:1-13. Article 205.

Ward, K.A. (2000) Transgene mediated modifications to animal biochemistry. TIB TECH 18, 99–102.

Ward, K.A. (2001) Phosphorus-friendly transgenics. Nat. Biotechnol. 19, 415–416.

Wee G., Shim J., Koo D., Chae J., Lee K. (2007) Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. Society for Reproduction and Fertiliy, 134 781-787.

Wells D.N., Miscia P.M., Tervit H.R. (1999) Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. Biology of Reproduction 60: 996-1005.

Wells D.N., Miscia P.M., Forsyth J.T., Berg M.C., Lange J.M., Tervit H.R., Vivanco W.H. (1999) The use of adult somatic cells nuclear transfer to preserve the last surviving cow of the Enderby island cattle breed. Theriogenology 217.

Wells, K. (2001) Toward knockout sheep. Nature Biotechnol. 19, 529 – 530.

Wells D.N., Laible G., Tucker F.C. et al. (2003) Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. Theriogenology 59: 45-59.

Wells K.D., and Prather R.S. (2017) Genome-editing technologies to improve research, reproduction and production in pigs. Mol Reprod Dev 84:1012-1017.

Wheeler, M.B. (1994) Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. Reprod. Fertil. Dev. 6, 563–568.

Wheeler, M.B., Bleck, G.T., Donovan, S.M. (2001) Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health. Reprod. Suppl. 58, 313–324.

Wheeler M.B, Walters E.M., Clark S.G. (2003) Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. Animal Reproduction Science 79, 265-289.

Whitelaw, E., Martin, D.I. (2001) Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. Nat. Genet. 27, 361–365.

Whitworth K.M., Prather R.S. (2010) Somatic cell nuclear transfer efficiency:how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? Mol Reprod Dev 77:1001-1015.

Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, Vol 385.

Wilmut I., Beaujean N., de Sousa P.A., Dinnyes A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N., Young L.E. (2002) Somatic cell nuclear transfer. Nature Vol 419, 583-586.

Wolf E., Schernthaner W., Zakhartchenko V., Prelle K., Stojkovic M., Brem G. (2000) Transgenic technology in farm animals, progress and perspectives. Experimental Physiology 85, 6, 615-625.

Wolf D.P., Mitalipov S., Norgren R.B. (2001) Nuclear transfer technology in mammalian cloning. Archives of Medical Research Vol.32-6, 609-613.

Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I., Colman, A. (1991) High level of expression of active alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Biotechnology 9, 830–834.

Wu X., Li Y., Li G.P., Yang D., Yue Y., Wang L. et al. (2008) Trichostatin a improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. Animal Biotechnology vol 19, issue 4, 211-224.

Xiangchen L.I., Yaxin Y., Yong Z., Dapeng J., Wang Y., Weijun G., Yuehui M.A. (2011) Different reprogramming ability of fibroblast cells and cumulus cells after treated with trichostatin A for nuclear transfer. Indian Journal of Animal Sciences 81 (4): 52-00.

Xue F., Tian X.C., Du F., Kubota C., Taneja M., Dinnyes A. et al (2002) Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. Nat Genet 31:216-220.

Yang, J., Ratovitski, T., Brady, J.P., Solomon, M.B. (2001) Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. Mol. Reprod. Dev. 60, 351–361.

Yao Y., Li X., Zhang Y, Guan W., Ma Y. (2009) Effect of different treatments with bovine cumulus cells as donor cells on cloning embryos. Chinese journal of animal veterinary sciences.

Yao Y.X., Guan W.J., Li X.C., Su X.H., Ma Y.H. ve Li H.P. (2012) Trichostatin A treatment on two types of donor cells for somatic cell nuclear transfer. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11: 1812-1818.

Yong H.Y., Hao Y., Lai L., Li R., Murphy C.N., Rieke A. (2006) Production of a transgenic piglet by a sperm injection technique in which no chemical or physical treatments were used for oocytes or sperm. Mol Reprod Dev 73:595–9.

Zawada, W.M., Cibelli, J.B., Chei, P.K., Clarkson, E.D., Golueke, P.J., Witta, S.E., Beil, K.P., Kane, J., Abel Ponce de Leon, F., Jerry, D.J., Robl, J.M., Freed, C.R., Stice, S.L. (1998) Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in Parkinson rats. Nat. Med. 4, 569–574.

Zernicka-Goetz M. (1994) Activation of embryonic genes during preimplantation rat development. Mol Reprod Dev 38:30-35.

Zhao J., Hao Y., Ross J.W., Spate L.D., Walters E.M., Samuel M.S., Rieke A., Murphy C.N., Prather R.S. (2010) Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo

developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. Cell Reprogram 12:75-83.

Zhao N., Q J., Zeng Z., Parekh P., Chang C.C. (2012) Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex. Journal of Controlled Release 159, 1, 104-110.

Zhu L., van de Lavoir M.C., Albanese J., Beenhouwer D.O., Cardarelli P.M., Cuison S. (2005) Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. Nat Biotechnol 23: 1159-69.

Zimmermann U., Vienken J. (1982) Electric field-induced cell-to-cell fusion. J Membr Biol 67:158-1174.

Zlatanova, J., Caiafa P. Ve Van H.K. (2000). Linker histone binding and displacement: Versatile mechanism for transcriptional regulation. FASEB J.,14: 1697-1704.

ETİK KURUL KARARI

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2016/ 33 30/06/2016

Sayın: Sayın Prof. Dr. Serhat PABUCCUOĞLU
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Doktora Öğrencisi Selin YAĞCIOĞLU**'na ait "**Klonlama İle Transgenik Koyun Üretiminde Donor Hücrelerin Nanopartiküller Kullanılarak Transfeksiyonu, Roscovıtıne Ve Trıchostatın-A İle Yeniden Programlanması**" başlıklı projeniz; incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği"nin 8.Maddesi (k-2) bendi hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda Avcılar –İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

PATENT HAKKI İZNİ

PATENT HAKKI İZNİ

Aşağıdaki Patent adı ve numaraları verilen gen taşıyıcı sistemlerin Arş.Gör.Selin YAĞCIOĞLU'nun "Klonlama ile Transgenik Koyun Üretiminde Donör Hücrelerin Nanopartiküller Kullanılarak Transfeksiyonu, Roscovitine ve Trichostatin A ile Yeniden Programlanması" başlıklı doktora çalışmasında kullanılmasına izin verilmiştir.

Prof.Dr.Erol İNCE

İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa
Rektör Yardımcısı

15.01.2021

Patent Adı	Patent Numarası
Kitosan Esaslı Bir Nanopartiküler Gen Taşıyıcı Sistemin Sentezi	TPE 2014/10605-09.09.2014
Synthesis of Nanoparticular Gene Carrier Systems Based On Chitosan	EP14184168.4-09.09.2014
Poli(β-aminoester) Esaslı Nanopartiküler Gen Taşıyıcı Sistemlerin Sentezi	TPE 2014/10603-09.09.2014
Synthesis of Nanoparticular Gene Carrier Systems Based On Poly(β-aminoesters)	EP14184166.8-09.09.2014

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SELİN	**Soyadı**	YAĞCIOĞLU
Doğ.Yeri	İSTANBUL	**Doğ.Tar.**	29.04.1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	34249773920
Email	selin.yagcioglu@istanbul.edu.tr	**Tel**	05339383218

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	-
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Lise	Özel Batı Fen Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2017-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	86,25	

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	79,22	78,57	68,82
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office programları	İyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

- The effect of swim up and Percoll gradient separation on ram sperm parameters, DNA integrity and embryo development (2019) Atalla H., Demir K., Yagcioglu S., Arici R., Ersoy N., Eser A., Coskun N., Armutak E.İ., Uvez A., Evecen M., et al. Revue de Medicine Veterinaire, cilt 170, 87-94.

- In vitro effect of recombinant human gonadotropins on meiotic competence of dog oocytes. Demir K., Evecen M., Arici R., Yagcioglu S., Ersoy N., Coskun N., Atalla H., Ak K., Birler S., Pabuccuoglu S. (2019) Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, cilt 43, 469-473.
- Effects of ovary transport and storage temperature on in vitro maturation and cumulus cell apoptosis rates in cat oocytes. (2018) Evecen M., Demir K., Arici R., Yagcioglu S., Ersoy N., Coskun N., Armutak E., Uvez A., Gurevin E.G., Eser A. et al. (2018) Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt 24, 301-306.
- Effect of cholesterol loaded methyl-beta-cyclodextrin on ovine oocytes during chilling and vitrification. Atalla H., Demir K., Arici R., Yagcioglu S., Eser A., Ersoy N., Coskun N., Alzuheir I., Evecen M., Birler S., et al. (2018) Revue de Medicine Veterinaire, cilt 169, 241-246.
- Somatic cloning in cats using MI or MII oocytes. (2016) Evecen M., Pabuccuoglu S., Demir K., Yagcioglu S., Can A., Erturk E., Sandal A.İ., Arici R., Ozturk G., Ak K., et al. (2016) Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, cilt 22, 923-928.
- Impacts of supplementary royal jelly on characteristics of post-thawed ram semen. Atalla H., Eser A., Demir K., Yagcioglu S., Arici R., Ersoy N., Evecen M., Ak K., Birler S., Pabuccuoglu S. (2019) International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology, cilt 6, 6-11.
- Köpeklerde Bruselloz ve klinisyen veteriner hekimlikteki önemi (2018) Baran A., Yagcioglu S. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi, cilt 1, 19-24.

Sertifikalar

- 2. Klinik Embriyoloji Derneği Sempozyumu, 1 Aralık, 2016 İstanbul
- 18. Uluslararası Hayvan Reprodüksiyon Kongresi, 26-30 Haziran, 2016 Tours, Fransa
- 13. Transgenik Teknoloji Toplantısı, 20-23 Mart, 2016 Prag, Çek Cumhuriyeti
- 13. Transgenik Teknoloji Toplantısı Kayıt Ödülü, Mart 20-23, 2016 Prag, Çek Cumhuriyeti
- Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği Kurulu (COST) Yönetim Kurulu Üyeleri Bilimsel Toplantısı BM1308 – Büyük Hayvan Modellerinde Gelişmelerin Paylaşılması, 13-16 Aralık, 2015 Poznan Polonya
- 3. Türk-Boşnak Bilim Günleri, İstanbul Üniversitesi ve Sarajevo Üniversitesi Veteriner Fakülteleri Ortaklığı Çerçevesinde, Bosna Hersek, 2015
- 4. Büyük ve Küçük Hayvan Klinik Uygulamaları Sempozyumu, Bosna Hersek, 2015
- Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği Kurulu (COST) Yönetim Kurulu Üyeleri Bilimsel Toplantısı BM1308, Açılış Konferansı, Aralık 2014, Münih Almanya
- Uluslararası VetİstanbuI Kongresi, 2014 İstanbul
- BD Accuri C6 Flow Sitometri Workshop, Mart 2014, İstanbul
- XIX. Flow Sitometri Eğitimi, 2013, İstanbul

- 29. Avrupa Embriyo Transfer Topluluğu Bilimsel Toplantısı, Eylül 2013, İstanbul
- 5. DETAE Günleri, Deneysel Araştırmalar ve Klinik Etkileri, Kasım 2013, İstanbul
- 7. Uluslararası Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi, 2013, Kars
- 17. FECAVA Avrupa Kongresi ve 6. TSAVA Kongresi, 2011 Veteriner Hekimliğe Endüstriyel Bakış, İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Profesyonel yüzme, geleneksel danslar, tenis